

DAS INSERTIONSELEMENT ISR1
AUS RHIZOBIUM LUPINI
UND SEINE MUTAGENE AKTIVITÄT
IM RESISTENZPLASMID RP4

von
Ursula Priefer
aus Amberg

1980

DAS INSERTIONSELEMENT ISR1 AUS RHIZOBIUM LUPINI UND SEINE MUTAGENE AKTIVITÄT IM RESISTENZPLASMID RP4

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades**

**vorgelegt von
Ursula Prierer
aus Amberg**

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1980

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter:

Professor Dr. A. Pühler

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. W. Heumann

I N H A L T

A : ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
B : EINLEITUNG	- 3 -
C : MATERIAL UND METHODEN	- 9 -
I : Bakterienstämme, Plasmide, Bakterio- phagen	- 9 -
II : Nährmdien, Puffer, Enzyme, Chemikalien	- 11-
III : Genetische Methoden	- 16 -
1. Kreuzungstechniken	- 16-
2. Transformation	- 17-
3. Transduktion	- 18-
4. Vermehrung von P1Cmts	- 19-
IV : Isolierung und Aufbereitung von Plasmid- DNA	- 20-
1. DNA-Isolierung über CsCl-EtBr-Dichte- gradientenzentrifugation	- 20-
2. Schnellverfahren zur Plasmid-Isolierung	- 23-
V : Agarosegelelektrophorese	- 25-
1. Elektrophorsepuffer	- 25-
2. Methode	- 25-
VI : Restriktionsanalyse	- 26-
1. Spaltung der DNA	- 26-
2. Größenbestimmung der Fragmente	- 27-
VII : Elektronenmikroskopie	- 28-
1. Erzeugung von DNA-Homoduplices	- 28-
2. Spreitung der DNA-Moleküle	- 29-
3. Kontrastierung der DNA-Moleküle	- 30-
4. Auswertung	- 30-
VIII: Genexpression in vivo	- 31-
1. Anzucht und Isolierung von E.coli- Minizellen	- 31-
2. Radioaktive Markierung	- 32-
3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Fluorographie	- 33-

D : ERGEBNISSE

I	: Isolierung von RP4-Mutanten aus Rhizobium lupini	- 37-
1.	Nachweis der RP4-Mutanten in Rhizobium lupini	- 37-
1.	Nachweis von Resistenz- und Plasmidverlust	- 37-
2.	Nachweis von RP4-Transfer- mutanten	- 38-
2.	Stabilisierung der RP4-Mutanten aus Rhizobium lupini durch Übertragung auf Escherichia coli	- 39-
1.	Transfer von RP4-Resistenzmutanten durch Konjugation	- 39-
2.	Übertragung von RP4-Transfer- mutanten	- 40-
3.	Transformation von E.coli C mit RP4- Mutanten DNA aus R.lupini	- 44-
4.	Herkunft und Eigenschaften der isolier- ten und untersuchten RP4-Mutanten	- 45-
II	: Nachweis des Insertionselementes ISR1 in den RP4-Mutanten	- 48-
1.	Physikalische und genetische Karte des RP4-Plasmids	- 49-
2.	Molekulare Struktur der RP4-Mutanten	- 52-
1.	Ap ^S RP4-Mutanten	- 52-
2.	Km ^S RP4-Mutanten	- 60-
3.	Ap ^S , Km ^S Mutanten	- 64-
4.	RP4-Transfermutanten	- 68-
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	- 75-
3.	Elektronenmikroskopische Darstellung der ISR1-Insertionen	- 79-

III : Mutagene Aktivität von ISR1 in Rhizobium lupini	- 83-
1. Beispiel 1: Verlust der Ap^r durch fortschreitende Deletionen nach In- sertion von ISR1	- 84-
2. Beispiel 2: Ausmaß der ISR1-stimulier- ten Deletionen	- 87-
3. Beispiel 3: Vielfalt gleichzeitig auftretender ISR1-induzierter Ver- änderungen des RP4-Moleküls	- 93-
IV : Inaktivität von ISR1 in Escherichia coli	-100-
1. Bestimmung der Verlust- und Mutations- rate von RP4::ISR1-Molekülen in E.coli	-100-
1. Stabilitätstest in Rec^+ - und Rec^- - Stämmen	-100-
2. Cycloserin-Anreicherung von Tc^S Kolonien	-103-
2. Fragmentanalyse der isolierten Resi- stenzmutanten	-105-
1. Restriktionsanalyse der Tc^S RP4- Mutanten	-105-
2. Charakterisierung der Ap^S Mutante von RP4-13.1	-108-
V : Veränderungen von Transposon-Eigenschaften durch die Insertion von ISR1 in Tn1	-110-
1. Transpositionsverhalten von Tn1::ISR1	-110-
1. Nachweis der Transpositionsfähigkeit	-110-
2. Transposition auf "multicopy" Plas- mide	-113-
3. Bestimmung der Transpositionsfrequenz	-117-
2. Veränderungen im Proteinmuster von Tn1::ISR1	-119-
1. Das Trägerplasmid pWK25.2	-120-
2. Das Proteinmuster von Tn1::ISR1	-122-

E : DISKUSSION

I	: RP4::ISR1-Mutanten: Allgemeine Betrachtung der ISR1-Insertionen und Rückschlüsse auf das RP4-Molekül	-125-
1.	ISR1-Insertionen im RP4-Plasmid	-125-
1.	Die Integrationsbereiche	-125-
2.	Die dreifache Insertion von ISR1 in RP4-5.82	-133-
2.	Deletionen im Zusammenhang mit ISR1	-135-
1.	Deletionen in Nachbarschaft von ISR1 _A	-135-
2.	Deletionen in Nachbarschaft von ISR1 _K	-137-
3.	Die Deletion in Plasmid RP4-5.4	-138-
II	: ISR1-bedingte Veränderungen im Transposon Tn1	-141-
1.	Das Transposon Tn1	-141-
2.	Strukturelle und funktionelle Organisation des Transposons	-142-
1.	Die β -Lactamase	-142-
2.	Das Regulationsprotein	-143-
3.	Gesamtstruktur von Tn3: Tn3-Gene und ihre Regulation	-144-
3.	Die Proteine von Tn1::ISR1	-146-
4.	Cisaktive Tn3-Funktionen	-148-
III	: ISR1- ein neues IS-Element?	-151-
1.	Definition und allgemeine Merkmale von translocierbaren Elementen	-151-
2.	Entdeckung und Klassifizierung von IS-Elementen	-152-
3.	ISR1 im Vergleich zu klassischen IS-Elementen	-153-

IV : Wechselwirkung zwischen ISR1 und seiner Wirtszelle	-162-
1. Herkunft von ISR1	-162-
2. Inaktivität von ISR1 in <i>Escherichia coli</i>	-163-
3. Aktivität und Funktion von ISR1 in <i>Rhizobium lupini</i>	-165-
Anhang 1: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	-171-
Anhang 2: Literaturverzeichnis	-175-

A : Z U S A M M E N F A S S U N G

Das Plasmid RP4 liegt in dem von Heumann (1968) beschriebenen *Rhizobium lupini*-Stamm instabil vor. Neben häufigem Plasmidverlust beobachtet man eine hohe Mutationsrate ($10^{-2} - 10^{-1}$) von Resistenz- und Transfergenen.

Mit Hilfe von Konjugation und Transformation wurden solche RP4-Mutanten nach *Escherichia coli* übertragen. Dort werden sie über viele Generationen hinweg stabil weitervererbt.

Die Fragmentanalyse der RP4-Mutanten führte zur Identifizierung einer 1.15 kb langen Insertionssequenz, ISR1 genannt, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII, PstI und BamHI in folgender Anordnung besitzt:

0.55 kb 0.25 kb
HindIII ----- PstI ----- BamHI

Es konnte gezeigt werden, daß auf dem RP4-Molekül spezifische Bereiche für die Insertion von ISR1 existieren.

Die Mutationen können auf zweifache Weise hervorgerufen werden: entweder durch direkte Integration von ISR1 in das betreffende Gen oder durch Deletionen, die an den Enden der Insertion beginnen und zum Teil nach beiden Richtungen verlaufen .

Die bevorzugte Integrationsregion von ISR1 ist das Ampicillintransposon des RP4-Plasmids, Tn1, in das ISR1 inseriert, ohne die Expression der Ap-Resistenz zu beeinflussen. Tn1::ISR1 zeigt eine bis zu Faktor 22 höhere Transpositionsfrequenz. Die Analyse der Genprodukte von Tn1::ISR1 erbrachte zwei Proteine, die im Proteinmuster des Wildtyp-Transposons nicht vorhanden sind. Ein Vergleich mit der Organisation des Transposons Tn3 macht die Annahme wahrscheinlich, daß es sich hierbei um die Transposase (> 100000 MW) und um einen verkürzten und daher inaktivierten Repressor (16500 MW) handelt.

B : E I N L E I T U N G

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im wesentlichen mit der Untersuchung von RP4-Plasmidmutanten, die aus dem Bodenbakterium *Rhizobium lupini* isoliert wurden.

Der natürliche Wirt des RP4-Plasmids, das in die Inkompatibilitätsgruppe IncP eingeordnet wird, ist *Pseudomonas aeruginosa*.

RP4 verleiht seiner Wirtszelle Resistenz gegen die Antibiotika Ampicillin (Ap), Neomycin/Kanamycin (Km) und Tetracyclin (Tc) (Datta et al., 1971; Datta und Hedges, 1972). Das Ap^r-Gen, das für die Produktion einer β -Lactamase (bla) codiert, ist auf einem Transposon, Tn1, lokalisiert (Hedges und Jacob, 1974; Heffron et al., 1975a,b; Campbell et al., 1977).

Die Länge des RP4-Plasmids wurde von Burkardt mit 19.1 μ m (= 57.4 kb) bestimmt (Burkardt et al., 1979a,b).

Resistenzplasmide mit diesen Eigenschaften wurden von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander isoliert und unter verschiedenen Bezeichnungen geführt:

- RP4 : Datta et al., 1971; Holloway und Richmond, 1973
- RK2 : Ingram et al., 1973; Meyer et al., 1977
- RP1 : Lowbury et al., 1969; Grinsted et al., 1972
- R68 : Black und Girdwood, 1969; Stanisich und Holloway, 1971
- R1822 : Grinsted et al., 1972

Diese Plasmide erweisen sich aber im Rahmen des elektronenmikroskopischen Auflösungsvermögens als identisch (Burkardt et al., 1979b).

Der breite Wirtsbereich des RP4-Plasmids, der fast alle gram⁻ Bakterien umfaßt (Datta und Hedges, 1972; Olsen und Shipley, 1973), ermöglicht seine Übertragung sowohl nach Entero- als auch nach Bodenbakterien. Neben der grundlegenden Analyse in *E. coli* (Datta et al., 1971) wurden Verhalten und Eigenschaften des RP4-Plasmids zum Beispiel auch in den

Bodenorganismen *Rhizobium trifolii* (O'Gara und Dunican, 1973) und *Rhizobium leguminosarum* (Beringer, 1974) untersucht.

Hedges (1971) transferierte das Plasmid RP4 in einen *Rhizobium lupini*-Stamm, der erstmals von Heumann (1968) beschrieben wurde. Dieser Stamm diente als Ausgangsmaterial für eine ausführliche genetische Charakterisierung des RP4-Plasmids in *R.lupini* (Pühler, 1976; Pühler et al., 1974; Pühler und Burkardt, 1978). Diese Untersuchungen ergaben, daß sich das Plasmid RP4 in *Rhizobium lupini* in manchen Punkten grundlegend anders verhält als in *E.coli*. Eine RP4-tragende *R.lupini*-Donorzelle ist z.B. nicht mehr in der Lage, chromosomale Gene zu transferieren, während RP4 in *E.coli* keinen Einfluß auf die Fertilität besitzt. Auffälligstes Merkmal in *R.lupini* ist die Instabilität und die hohe Mutationsfrequenz des RP4-Plasmids.

a) Instabilität

Wächst man RP4-tragende *R.lupini*-Zellen ohne Selektion in antibiotikafreiem Medium und testet Einzelkolonien auf ihre Resistenzmarkierungen, sind mit einer Häufigkeit von 50 - 60 % keine RP4-Marker mehr nachzuweisen.

Diese Instabilität ist keine generelle Eigenschaft des RP4-Plasmids, da bei parallelen Versuchen in *E.coli* kein Plasmidverlust zu beobachten ist.

b) Erhöhte Rate von Plasmid-Mutationen

Zusätzlich zu diesem vollständigen Plasmidverlust treten Mutationen auf, die in großer Häufigkeit ohne spezielle Selektionsverfahren nachzuweisen sind. Pühler gibt eine Rate von 1-2% an, mit der ein RP4-tragender *R.lupini*-Stamm Mutanten segregiert, die die Resistenz gegen Ampicillin (Ap^S), Kanamycin (Km^S) oder gegen beide Antibiotika (Ap^S, Km^S) verloren haben. Noch häufiger beobachtet er die Entstehung transferdefekter (Tra^-) RP4-Derivate (bis zu 10%). In seiner Arbeit stellt Pühler ein Modell auf, das die Entstehung dieser Mutanten durch Deletionsvorgänge zu erklären versucht. Erhärtet wurde diese

Hypothese unter anderem durch die elektronenmikroskopische Darstellung von Plasmid-DNA aus stationären RP4-tragenden *R.lupini*-Stämmen, in der neben der Original-RP4 Länge von 19.1 μ m auch kleinere Plasmidringe bis zu 1 μ m beobachtet wurden (Tucher, 1974).

Spitzbarth (1978) untersuchte im Rahmen seiner Dissertationsarbeit eine Ap^S und eine Km^S RP4-Mutante aus dem *R.lupini*-Stamm 1-624. Die grundsätzlichen Ergebnisse seiner Analyse sind im folgenden zusammengefaßt:

- In der Ap^S Mutante tritt im Bereich des Ampicillin-gens (innerhalb Transposon Tn1) eine Insertion von ungefähr 1100 bp auf, die in der Fragmentanalyse durch das Auftreten von drei neuen Restriktionsstellen - je eine für BamHI, PstI und HindIII - erkennbar wird. An gleicher Position ist eine Deletion nachzuweisen, die sich in der Restriktionsanalyse durch das Fehlen der im Ap-Gen lokalisierten PstI-Stelle manifestiert. Durch diese Deletion läßt sich der Ap^S Phänotyp erklären.
- Die Km^S Mutante trägt ebenfalls eine Insertion innerhalb der Tn1-Region, die in Bezug auf Länge, Restriktionsstellen und Orientierung mit dem in dem Ap^S Plasmid gefundenen DNA-Element übereinstimmt. Eine zweite Insertion liegt in der Plasmidregion, die für die Km-Resistenz codiert. Hier konnte das Auftreten einer neuen HindIII-Erkennungsstelle nachgewiesen werden. Die Integration dieses DNA-Elements scheint für den Verlust der Km-Resistenz verantwortlich zu sein.

Diese Resultate werfen eine Reihe von Fragen auf, die zum Teil in der vorliegenden Arbeit behandelt werden. Die auffallende Übereinstimmung der von Spitzbarth charakterisierten Tn1-Insertionen in zwei phänotypisch verschiedenen Mutanten gibt Anlaß zu der Vermutung, daß es sich um das gleiche DNA-Element handelt.

Durch eine breit angelegte molekularbiologische Untersuchung von RP4-Mutanten, die unabhängig voneinander aus *R.lupini*

zu isolieren sind, soll geklärt werden, ob diese Mutanten generell durch Insertionen gekennzeichnet sind und inwieweit die integrierten DNA-Elemente Gemeinsamkeiten aufweisen. Hand in Hand mit diesem Untersuchungsprogramm geht die Frage nach weiteren Integrationsstellen, die durch Analyse von transfernegativen RP4-Mutanten geklärt werden soll.

In einem weiteren Untersuchungspunkt soll das Verhalten der RP4-Mutanten in *Escherichia coli* analysiert werden. Während in *R.lupini* die RP4-Mutanten ebenso instabil vorliegen wie das Wildtyp-Plasmid, wurden bisher nach Transfer von RP4-Resistenzmutanten in *E.coli* keine weiteren Veränderungen des Plasmid-Phänotyps beobachtet. Die Richtigkeit dieses Befundes soll durch einen auf breiter Basis angelegten Stabilitätstest überprüft werden.

Die Untersuchung der RP4-Mutanten in *R.lupini* wurde erschwert durch die in *R.lupini* auftretenden hohen Mutationsraten. Im wesentlichen traten dabei zwei Schwierigkeiten auf:

- Isolierung homogener Plasmid-DNA

Da während der Anzucht eines plasmidtragenden *R.lupini*-Stammes laufend Mutationen und Veränderungen am RP4-Molekül auftreten, ist die aus diesem Stamm isolierte Plasmid-DNA nicht homogen und daher ungeeignet für eine molekularbiologische Charakterisierung. Daher wurden die mutierten Plasmide durch Übertragung auf *E.coli* stabilisiert und die aus diesen Stämmen gewonnene Plasmid-DNA für die weitere Analyse verwendet.

- Nomenklatur der RP4-Mutanten

Aus dem gleichen Grund ergaben sich Probleme bei der Nomenklatur der Plasmidmutanten. Da Resistenz- und Transfereigenschaften einer Plasmidmutante in *R.lupini* nicht stabil sind, ist es nicht möglich, die RP4-Mutanten innerhalb *R.lupini* mit einer Nummer definitiv

zu benennen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidbezeichnungen beziehen sich daher auf die Plasmidmarkierungen, die sich nach dem Transfer in *E.coli* stabil manifestierten.

C : MATERIAL UND METHODEN

C.I : BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE, BAKTERIOPHAGEN

Die in dieser Arbeit verwendeten *E.coli*- und *R.lupini*-Stämme sind in untenstehender Tabelle aufgelistet.

Die *R.lupini*-Stämme sind in den Arbeiten von Heumann (1968), Pühler (1971) und Heumann et al. (1971; 1973) ausführlich charakterisiert.

	STAMM	EIGENSCHAFTEN	HERKUNFT
E.coli	E.coli C	his, Nx	R.Simon
	CSH 50	thi, ara, Sm $\Delta(lac,pro)$, F ⁻	A.Pühler
	CSH 51	thi, ara, Sm $\Delta(lac,pro)$, F ⁻ ($\phi 80dlac$)	
	CSH 52	thi, ara, Sm $\Delta(lac,pro)$, F ⁻ ($\phi 80dlac$), recA	
	CSH 56	thi, ara, Nx $\Delta(lac,pro)$, F ⁻	
	CSH 23	thi, $\Delta(lac,pro)$ F'(lac,pro)	
	CR 34	thy, thr, leu, thi ColE1	
	DS 410	minA, minB, F ⁻	J.Reeve
R. lupini	1-491	thi, Sm, carl Fc ⁺ Fd ⁺	W.Heumann
	1-250	prt, cary Fc ⁺ Fd ⁺	

Alle in dieser Arbeit untersuchten RP4-Mutanten gehen auf den *Rhizobium lupini*-Stamm 1-491(RP4) zurück. Die Eigenschaften der daraus abgeleiteten Mutantenstämme sind nachfolgender Zusammenstellung zu entnehmen.

Stamm	Plasmidmarker in R.lupini	Plasmid- ^(a) bezeichnung
M 137-2	Ap ^r Km ^s Tc ^r Tra ⁺	RP4-3.1
M 137-3	Ap ^s Km ^r Tc ^r Tra ⁺	RP4-2.1
M 137-4	Ap ^s Km ^r Tc ^r Tra ⁺	RP4-2.2
M 137-5	Ap ^s Km ^r Tc ^r Tra ⁺	RP4-2.3
M 137-5.1	Ap ^s Km ^s Tc ^r Tra ⁻	RP4-5.4
M 137-6	Ap ^r Km ^s Tc ^r Tra ⁺	RP4-3.2
M 137-6.1	Ap ^s Km ^s Tc ^r Tra ⁺	RP4-5.2
M 137-6.2	Ap ^s Km ^s Tc ^r Tra ⁺	RP4-5.3
M 137-7	Ap ^s Km ^s Tc ^r Tra ⁺	RP4-5.8
M 137-12	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ^{d(b)}	RP4-12
M 137-13	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ^{d(b)}	RP4-13
M 137-13.1	Ap ^s Km ^r Tc ^r Tra ^{d(b)}	RP4-13.5

(a) Wegen der hohen Instabilität der RP4-Mutanten in R.lupini liegt in all diesen Stämmen eine heterogene Plasmidpopulation vor. Die Nomenklatur in dieser Spalte bezieht sich auf das Plasmidmuster, das sich nach Übertragung in E.coli stabil etablierte (vergl. D.I.4).

(b) Tra^d bezeichnet Plasmide mit einem defekten Transferverhalten. Es ist nicht in allen Fällen gleichbedeutend mit Transfernegativität (Tra⁻).

Die verwendeten Plasmide und Bakteriophagen sind in untenstehender Tabelle zusammengestellt.

	Bezeichnung	Phänotypische Eigenschaften	Herkunft
PLASMIDE	RP4	Ap, Km, Tc, Tra	R.Hedges
	pBR 322	Cm, Tc	A.Pühler
	pWK 25.2	Tc	W.Klipp
	pFS 2o2	Tc	F.Schöffl
PHAGEN	P1kc	-	R.Simon
	P1Cmts	Cm, c1-ts	L.Taylor

C.II: NÄHRMEDIEN, PUFFER, ENZYME, CHEMIKALIEN

II.1: NÄHRMEDIEN

II.1.1: Nährmedien für E.coli-Stämme

Vollmedien:

PA : Penassay broth (Difco); pro Liter 17.5 g

LB : Luria Broth (Miller, 1972);

pro Liter: 10 g Bactotryptone (Difco)

5 g Yeast Extract (Difco)

5 g NaCl

1 g Glucose

pH 7.2;

RG : pro Liter: 10 g Bactotryptone

1 g Yeast Extract

8 g NaCl

1 g Glucose

pH 7.6

Vollmedien mit Zusätzen:

LBCa: pro Liter LB-Medium : 10 ml CaCl_2 (0.5 M)

5 ml Glucose (20%ige Lösung)

RGMC : pro Liter RG-Medium: 1.0 g $MgCl_2$
0.3 g $CaCl_2$

RGNC : RG-Medium, Zugabe von Natriumcitrat (50 mM)

Indikatormedium für Lactoseabbau: EMBlac (Miller, 1972)

10 g Bactotryptone (Difco)
1 g Yeast Extract (Difco)
5 g NaCl
2 g KH_2PO_4
10 ml Eosin yellow (4%ige Lösung)
10 ml Methylene blue (0.65%ige Lösung)
50 ml Lactose (20%ige Lösung)

Medium zum Test auf Colicin-Immunität:

0.5 ml ÜN-Kultur eines ColE1-tragenden E.coli-Stammes werden auf frischen PA-Platten ausgespatelt und 2 Stunden bei 37°C gewachsen. Durch kurzzeitige UV-Bestrahlung (ca. 5 sec.) werden die Zellen zur Colicin-Produktion angeregt. Anschließend wird weiter bei 37°C inkubiert, bis sich ein dichter Bakterienrasen ausgebildet hat (ca. 5 Stunden); das synthetisierte Colicin wird von den Zellen ausgeschieden und diffundiert in das Medium.

Die Bakterien werden durch Chloroformdämpfe abetötet; der Rasen wird anschließend mit einem sterilen Wattebausch vollständig entfernt.

Diese Platte kann nun wie jede andere Antibiotikaplatte als Indikatormedium für Colicin-Immunität verwendet werden.

Minimalmedien:

M9-Medium : pro Liter: 1.0 ml $MgSO_4$ (1 M)
0.1 ml $CaCl_2$ (1 M)
10.0 ml Glucose (20%)
100.0 ml M9-Salze (10x) (siehe C.II.2)

DMglu-Medium: pro Liter: 10.5 g K_2HPO_4
4.5 g KH_2PO_4
1.0 g $(NH_4)_2SO_4$
0.5 g Na-citrat x 2 H_2O

nach dem Autoklavieren:

1 ml $MgSO_4$ x 7 H_2O (1 M)
10 ml Glucose (20%ige Lsg.)

Aminosäuren werden den Minimalmedien in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben.

Antibiotika-Zusätze:

Ampicillin : 100 µg/ml (Höchst)
Kanamycin : 50 µg/ml (Grünethal)
Tetracyclin : 20 µg/ml (Höchst)
Streptomycin : 200 µg/ml (Serva)
Nalidixin : 100 µg/ml (Serva)
Chloramphenicol: 100 µg/ml (Serva)

Festmedien: 15 g Bacto Agar (Difco) pro Liter Flüssigmedium

Weichagar : 6.5 g Bacto Agar (Difco) pro Liter Flüssigmedium

II.1.2: Nährmedien für R.lupini-Stämme

Vollmedien:

NB : Nutrient broth (Difco)
YNB : pro Liter: 8 g NB
3 g Yeast Extract (Difco)

Minimalmedien:

MM : Minimalmedium nach Heumann (1968)

Antibiotika-Zusätze:

Ampicillin : 400 µg/ml
Kanamycin : 30 µg/ml
Tetracyclin : 40 µg/ml
Streptomycin : 200 µg/ml

Festmedien: 15 g Bacto Agar (Difco) pro Liter Flüssigmedium

II.2 : PUFFER UND ANDERE LÖSUNGEN

Puffer:

TE : 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 bzw. pH 8.0
TES : 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.0
SM : 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM Tris, pH 7.5
SMCa: wie SM-Puffer + 5 mM CaCl₂
PS : 8.5 g NaCl pro Liter H₂O
TCM : 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris, pH 7.5

MS-Salze: pro Liter 6.0 g Na_2HPO_4
 3.0 g KH_2PO_4
 0.5 g NaCl
 1.0 g NH_4Cl

Andere Puffer und Lösungen, z.B. für Elektrophoresen und Restriktionsspaltungen werden im Zusammenhang mit den jeweiligen Methoden aufgeführt.

II.3 : ENZYME

Restriktionsenzyme:

EcoRI : Dr. Rösch, Erlangen
BamHI : Böhlinger, Mannheim
HindIII : Böhlinger, Mannheim
PstI : Dr. Rösch, Erlangen
 Dr. Mayer, Braunschweig
SmaI : Dr. Rösch, Erlangen

Sonstige Enzyme:

Lysozym : Böhlinger, Mannheim
DNase : Serva, Heidelberg
RNase : Serva, Heidelberg

II.4 : CHEMIKALIEN UND ANDERE SUBSTANZEN

Acrylamid, ultrapure	}	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid		
Mercaptoäthanol		
TEMED		
Triton X 100		
Visking Dialyseschlauch		
Polyäthylenglykol	}	BioRad
Bisacrylamid, ultrapure		
SDS, ultrapure		
Agarose		Seakem, MCI Biochemicals Rockland Maine USA
D-Cycloserin		Sigma
Filterpapier		Whatman
L-(^{35}S)-Methionin		Amersham Buchler (300-800 Ci/mMol) (300-800 Ci/mMol)

Nitrocellulose Filter	Sartorius
Sarkosyl NL 30	Geigy, Basel
Tris-Base, ultrapure	Schwartz-Mann

Alle nicht einzeln aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

II.5 : GERÄTE

Zentrifugation: KÜhlzentrifugen, präparative Ultrazentrifuge
und Rotoren der Firma Beckman

Elektronenmikroskopie: Bedampfungsanlage: JEOL JEE 4B
Elektronenmikroskope: JEOL JEM 7A
Philips EM 400

Radioaktivitätsmessung: Liquid Scintillation counter der
Firma Beckman

Photographische Arbeiten: Transilluminator der Firma Hormuth
und Vetter
Polaroid Kamera MP4 und Polaroid
Filme Typ 655

C.III : GENETISCHE METHODEN

III.1 : KREUZUNGSTECHNIKEN ZUR ÜBERTRAGUNG VON PLASMIDEN

III.1.1: Konjugation in Flüssigmedium

Diese Kreuzungsmethode eignet sich vor allem für den RP4-Transfer innerhalb E.coli-Stämmen.

Übernacht-Kulturen der Elternstämme werden in frisches Vollmedium (PA oder LB) überimpft und bei 37°C bis zur logarithmischen Phase angezogen. Eine Mischung aus Donor- und Rezipientenkultur im Verhältnis 1:1 wird für durchschnittlich 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch kräftiges Schütteln (Vortex) trennt man die Kreuzungspartner. Eine Verdünnungsreihe in PS- oder SM-Puffer wird auf selektive Platten ausgespartelt, die bei 37°C über Nacht inkubiert werden.

Zur Sekundärselektion werden Einzelkolonien der Transkonjuganten mit Hilfe steriler Zahnstocher in einem bestimmten Muster auf PA-Platten übertragen und nach Anwachsen der Kolonien durch Stempeln auf vorhandene Markierungen getestet.

III.1.2: Filterkreuzung

Um eine Erhöhung der Transferrate zu erzielen, empfiehlt sich, die Konjugation auf Nitrocellulose (NC)-Filtern durchzuführen. Dazu werden NC-Filter (Porengröße 0.45 µm) steril auf eine Vollmediumsplatte gegeben und Rezipient und Donor im gleichen Verhältnis auf den Filter aufgetropft.

Nach Inkubation der Kreuzungsplatte (einige Stunden oder über Nacht) überträgt man die Filter in 5 ml Puffer (PS, SM) und wäscht die Kreuzungspartner durch kräftiges Schütteln vom Filter ab.

Primär- und Sekundärselektion erfolgen wie in III.1.1.

III.1.3: Schnellkreuzung (Cross streaking)

Für einen groben Test auf Transferierbarkeit eines Plasmids oder zur einfachen Konstruktion eines plasmidtragenden Stam-

mes wurde folgendes Kreuzungsverfahren verwendet:
eine Übernachtskultur des Rezipientenstammes wird auf einer selektiven Platte mit einer Öse in einer Linie ausgestrichen. Nach dem Eintrocknen streicht man den in Flüssigmedium angezogenen, plasmidtragenden Donorstamm quer dazu und inkubiert die Platte über Nacht.

Im Kreuzungsbereich wachsen nach erfolgtem Plasmidtransfer Transkonjuganten hoch. Nach Isolierung von Einzelkolonien werden die Transkonjuganten durch Überstempeln auf das Vorliegen aller Plasmidmarker getestet.

III.2 : TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA

III.2.1 : Isolierung kompetenter E.coli-Zellen

Eine Übernachtskultur des Rezipientenstammes wird 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 - 0,6 angewachsen. Die Kultur wird 5 min bei 6000 rpm, 5°C abzentrifugiert, in 1/2 Volumen 0,05 M CaCl_2 (eiskalt) resuspendiert und 15 min im Eis stehen gelassen.

Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 1/10 Vol. kaltem CaCl_2 (0,05 M) aufgenommen.

Die so vorbereiteten Rezipienten müssen sofort für den Transformationsversuch verwendet werden.

III.2.2 : Transformation

0,2 ml der nach oben stehender Vorschrift hergestellten kompetenten Zellen werden mit 100 μl Plasmid-DNA Lösung in TCM gemischt und 15-20 min bei 0°C inkubiert. Danach erfolgt ein 3minütiger Hitzeschock bei 40-42°C. Nach Abkühlen des Transformationsgemisches auf Raumtemperatur werden pro Ansatz 0,7 ml LB-Medium zugegeben und die Suspension 30 min bei 37°C bewegt.

Geeignete Verdünnungsstufen werden auf selektive Platten ausgespatelt und die Transformanten auf erworbene Plasmideigenschaften getestet.

Bei primärer Selektion auf Ap-Resistenz empfiehlt sich eine Vorinkubation des Transformationsgemisches in Ap-haltigem LB-Flüssigmedium.

III.3 : TRANSDUKTION MIT DEM PHAGEN P1kc

P1kc ist ein allgemein transduzierender Phage und kann neben chromosomalen Genen auch Plasmide geeigneter Größe auf den Rezipienten übertragen. Diese Methode wurde vor allem zur Übertragung von transfernegativen RP4-Mutanten herangezogen.

III.3.1 : Herstellung eines transduzierenden P1kc-Lysats

Zur Erzeugung eines P1kc(RP4)-Lysats muß der Phage auf einem RP4-tragenden Stamm vermehrt werden.

Dazu wird eine Übernachtskultur des betreffenden Stammes abzentrifugiert und in gleicher Menge SMCa-Puffer aufgenommen. 0.1 ml dieser Bakteriensuspension und 0.1 ml einer P1kc-Verdünnung werden zusammen in 2.5 ml RGMC-Weichagar auf RGMC-Platten ausgegossen und bei 37°C ca 12-14 Stunden inkubiert, bis konfluente Lyse eintritt.

Die Platten werden mit SMCa-Puffer überschichtet und einige Zeit stehen gelassen. Die Phagenpartikel diffundieren in den Puffer und können abgeschwemmt werden.

Zur Abtötung der noch vorhandenen Bakterien wird das Lysat mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und nach 10-15 Minuten abzentrifugiert (5 min bei 10000 rpm). Bakterien und Zellbestandteile sedimentieren, während die Phagen im Überstand bleiben.

III.3.2 : Transduktion

Eine dichtgewachsene RGMC-Kultur des Rezipientenstammes wird in verschiedenen Multiplizitäten (0.1 - 0.01) mit dem transduzierenden Phagenlysate P1kc(RP4) infiziert. Nach 30 minütiger Adsorptionszeit bei 37°C werden die Zellen abzentrifugiert und in RGNC-Medium aufgenommen.

Die Selektion auf RP4-Transduktion erfolgt auf PA+Tc-Platten. Zur Charakterisierung der Transduktanten werden Einzelkolonien auf Ap-, Km- und Tc-Resistenz getestet.

III.4 : VERMEHRUNG VON P1Cmts

Der Phage P1Cmts (Rosner, 1972) besitzt einen temperatursensitiven c1-Repressor (ts) und ist an seiner Chloramphenicolresistenz (Cm) leicht zu erkennen.

Der Wirtsstamm AT 3293 (P1Cmts) wurde unserem Labor von L. Taylor (Denver) zur Verfügung gestellt.

III.4.1 : Lysogenisierung

Der Rezipientenstamm wird in RGMC-Medium bis zu einer Zelldichte von 2×10^8 Bakterien/ml angezogen. 1 ml dieser Kultur und 1 ml eines P1Cmts-Phagenlysates werden vermischt (Multiplizität = 1) und 30 min bei 32°C inkubiert. Danach erfolgt die Selektion auf P1Cmts-lysogene Bakterien durch Ausspateln auf LBCm-Platten, die bei 32°C über Nacht bebrütet werden.

III.4.2 : Hitze-Induktion

Auf Grund des temperatursensitiven Repressors läßt sich ein lysogen vorliegender P1Cmts-Phage durch einfache Temperaturerhöhung von 32°C auf 44°C in den lytischen Zustand versetzen und damit zur Vermehrung induzieren.

Die lysogenen Bakterien werden in RGMC-Medium bei 32°C bis zu einem Titer von 6×10^8 Bakterien/ml gewachsen. Da erfahrungsgemäß ein Hitzeschock für die Induktion effektiver ist als eine langsame Temperaturerhöhung, wird die Bakterienkultur mit 50° warmen RGMC-Medium auf eine optische Dichte von ungefähr 0.2 - 0.25 herunterverdünnt und 30-45 min lang bei 44°C inkubiert.

Anschließend werden die Kulturen bei 37°C langsam bewegt, bis die Lyse der Bakterien eingetreten ist. Die nun klare Suspension wird mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und ca. 15 min stehengelassen, um nicht lysierte Bakterien abzutöten.

Danach werden die restlichen Zellfetzen durch niedertouriges Zentrifugieren (5 min, 15000 rpm) pelletiert.

Das Phagenlysate wird über Chloroform aufbewahrt.

C.IV.: ISOLIERUNG UND AUFBEREITUNG VON PLASMID-DNA

IV.1 : DNA-ISOLIERUNG ÜBER CSCL-ETBR-ZENTRIFUGATION

IV.1.1: Zellaufschlußmethoden

1.1.1: Sarkosyl-Lyse (Bazarał und Helinski, 1968)

Bei dieser Methode wird durch das Reagenz Sarkosyl die bakterielle Zellmembran vollständig zerstört und dadurch der gesamte Zellinhalt freigesetzt. Um im Dichtegradienten eine Überlagerung der Plasmidbande durch das breit bandierende Chromosom zu verhindern, muß zum einen das Chromosom durch kräftiges Scheren des Lysats in lineare Bruchstücke überführt, zum anderen die Menge der zu lysierenden Bakterienzellen möglichst gering gehalten werden.

Dieses Verfahren eignet sich daher vor allem für "multi-copy" Plasmide, also für Plasmide, die in einer sehr hohen Kopienzahl in der Bakterienzelle vorliegen.

Auch für die Isolierung von RP4-DNA aus *R. lupini*-Stämmen wurde diese Methode angewendet, da das in 1.1.2 beschriebene "cleared lysate" Verfahren bei Rhizobien-Stämmen zu keinem Erfolg führte.

Für 30 ml Übernachtskultur gelten folgende Angaben:

- Zellen durch niedertouriges Zentrifugieren ernten (8000 rpm, 10 min) und 2x in TES waschen;
- Pellet resuspendieren in 0.75 ml 20%iger Sucrose in TES, 15 min bei 0°C stehen lassen;
- Zugabe von 0.75 ml Lysozym/RNase-Gemisch (2 mg/ml Lysozym, 1 mg/ml RNase in H₂O), 30 min bei 37°C unter gelegentlichem Bewegen inkubieren;
- Zugabe von 0.3 ml Sarkosyl-Lösung (10%ig in 0.25 M EDTA), drehen bis Suspension vollständig aufklart;
- das viskose Lysat mit einer 2ml-Einmalspritze mit Kanüle kräftig scheren, bis die Viskosität deutlich abgenommen hat;
- das dünnflüssige Lysat mit TES auf 5 ml auffüllen;
- Weiterbehandlung siehe C.IV.1.2

1.1.2: "Cleared lysate" Methode (modifiziert nach Glover, 1976)

Das Prinzip dieses nach Glover (1976) modifizierten Verfahrens besteht darin, daß nach Abbau der Zellwand mit Lysozym durch das Detergenz Triton X 100 nur eine teilweise Zerstörung der Zellmembran erreicht wird. Durch diese schonende Behandlung bleibt die chromosomale DNA zum großen Teil an die Membranbruchstücke gebunden und kann durch Zentrifugation sedimentiert werden. Der Überstand, das sogenannte "cleared lysate", enthält daher vorwiegend Plasmid-DNA und lösliche Zellbestandteile und kann direkt für die CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation verwendet werden. Die weitgehende Abtrennung des Chromosoms erlaubt die Aufbereitung größerer Bakterienmengen und ist daher besonders für die Isolierung von "single copy" Plasmiden (z.B. RP4) geeignet.

Die folgenden Angaben gelten für 100 ml Übernachtkultur:

- die Zellen werden durch niedertouriges Abzentrifugieren (8000 rpm, 10 min) geerntet und 1-2x in kaltem TE-Puffer, pH 8.0, gewaschen;
- Pellet resuspendieren in 1.25 ml kalter 20%iger Sucrose in 50 mM Tris, pH 8.0;
- 0.5 ml frisches Lysozym (10 mg/ml H₂O) zugeben und 5 min bei 0°C inkubieren; vorsichtig schütteln;
- Zugabe von 0.5 ml EDTA (0.5 M, pH 8.5), 5 min bei 0°C, leicht bewegen;
- Zugabe von 2.5 ml Triton X 100-Lösung (0.1% Triton X 100 in 0.06 M EDTA, 0.05 M Tris), 10 min bei 0°C unter leichtem Schütteln inkubieren;
- Zentrifugation: 30 min, 20000 rpm (45000 x g), 4°C;
- Überstand ("cleared lysate") vorsichtig abgießen und mit TE auf 5 ml auffüllen;
- Weiterbehandlung siehe CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation (C.IV.1.2)

IV.1.2 : CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

1.2.1: Prinzip

Interkalierende Substanzen wie der Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) schieben sich auf Grund ihrer flachen Molekülstruktur zwischen benachbarte Basen der DNA-Doppelhelix und erniedrigen dadurch deren Dichte. Dabei können in lineare DNA und offene DNA-Ringe (oc-Form) mehr EtBr-Moleküle eingelagert werden als in kovalent geschlossene Plasmide (ccc-Form), bei denen die Interkalierung durch die Überdrehung der DNA-Stränge ("Supertwist") sterisch eingeschränkt ist.

Die ccc-Form der Plasmid-DNA bandiert demzufolge im CsCl-EtBr-Dichtegradienten an einer Stelle höherer Dichte als die oc-Form und die linearen Bruchstücke des Chromosoms.

1.2.2: Methode

Die nach IV.1.1 erhaltenen Lysate werden mit 0,15 ml EtBr-Lösung (10 mg/ml) und 5,0 g CsCl in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen gut durchmischt. Die Röhrchen werden bis zum Rand mit dünnflüssigem Paraffin gefüllt und luftdicht verschlossen. Es wird bei $100000 \times g$ (34000 rpm), 25°C , für mindestens 42 Std. zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation werden die Gradienten seitlich mit langwelligem UV-Licht ($\lambda = 360 \text{ nm}$) bestrahlt. Dadurch wird der DNA-EtBr-Komplex zur Fluoreszenz angeregt und die entstandenen DNA-Banden werden optisch sichtbar gemacht.

Die unterhalb der chromosomalen Fraktion bandierende Plasmid-DNA wird mit einer Spritze abgezogen.

IV.1.3 : Aufbereitung der isolierten Plasmid-DNA

1.3.1: Entfernung von EtBr

Durch mehrfaches Ausschütteln mit Isoamylalkohol (Verhältnis 1:1) werden die abgezogenen DNA-Fractionen entfärbt. Der größte Teil des EtBr geht dabei in die Alkoholphase über, die wässrige DNA-Lösung wird mit einer Spritze von unten abgezogen.

1.3.2: Entfernung von CsCl

Die entfärbten DNA-Proben werden in Dialyseschläuche umgefüllt, die vorher 20 min in Puffer gekocht oder autoklaviert wurden, und ausgiebig gegen TE-Puffer, pH 7.5, bei 4°C dialysiert. Der Dialysepuffer wird mehrmals in Abständen von 2 - 4 Stunden gewechselt.

1.3.3: Konzentrierung

Eine Konzentrierung der DNA-Lösung erreicht man durch Dialyse gegen 10%ige PEG-Lösung (PEG 4000 in TE-Puffer). Vor der Entnahme der DNA-Proben müssen die Dialyseschläuche sorgfältig von PEG gesäubert werden, am besten durch erneute Dialyse gegen TE-Puffer.

1.3.4: Deproteinisierung

Zur Extraktion von Proteinen werden die DNA-Proben mit gleichen Volumina TE-gesättigtem, frisch destilliertem Phenol ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen; Phenolrückstände werden durch Dialyse oder durch Zugabe von Äther extrahiert.

Die so präparierte Plasmid-DNA wird fraktioniert und in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20°C oder im Kühlschrank aufbewahrt.

IV.2 : SCHNELLVERFAHREN ZUR PLASMID-ISOLIERUNG

IV.2.1 : "Mini cleared lysate"

Diese Methode eignet sich zur schnellen Isolierung von kleinen "multi copy" Plasmiden.

4 ml einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert (5000 rpm, 7-10 min), und der Überstand wird quantitativ entfernt. Das Pellet wird in 50 µl Sucrose (20%ig in 40 mM Tris, pH 8.0) aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt.

Die folgenden Schritte werden in Eiswasser durchgeführt:

- Zugabe von 10 μ l Lysozym (5 mg/ml in H_2O), 10 min;
- 20 μ l EDTA (25 mM, pH 8.0), 10 min;
- 50 μ l Lytic mix (40 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% Triton X 100).

Die viskose Lösung wird abzentrifugiert (15000 rpm, 30 min, 5°C). Der Überstand wird mit 100 μ l gesättigtem Phenol und 100 μ l H_2O versetzt und kräftig geschüttelt. Zentrifugation führt zur Trennung der Phasen. Die wässrige Phase wird abgenommen und nochmals mit 50 μ l Phenol und 40 μ l NaCl vermischt.

Nach erneuter Zentrifugation wird die wässrige Phase mit eiskaltem absoluten Äthanol im Verhältnis 1:4 vermischt und ca. 3 min bei -80°C inkubiert. Die ausgefällte DNA wird pelletiert, mit kaltem 80%igem Äthanol gewaschen und in 100 μ l H_2O aufgenommen.

Die so isolierte DNA kann direkt für Transformationsversuche oder auch für Restriktionsspaltungen verwendet werden.

IV.2.2 : Herstellung eines Rohlysates durch SDS-Behandlung

1 ml einer Übernachtskultur eines plasmidtragenden Stammes wird in Eppendorfgefäßen abzentrifugiert und das Pellet in 50 μ l 20%iger Sucrose aufgenommen.

Folgende Lösungen werden nacheinander zugesetzt:

- 50 μ l Lysozym (10 mg/ml in H_2O), 5 min;
- 50 μ l EDTA (250 mM), 5 min;
- 10 μ l SDS (25%ige Lösung);
- 100 μ l Phenol (TE-gesättigt);
- 100 μ l H_2O .

Nach kräftigem Vermischen (Vortex) wird abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wird abgenommen.

Er enthält sowohl chromosomale als auch extrachromosomale DNA und wurde in erster Linie zum Nachweis von Plasmiden oder zur groben Charakterisierung von Plasmidlängen verwendet.

Nach Anfärben mit Bromphenolblau kann dieses Rohlysat di-

rekt auf Agarosegele (Tris-Acetat oder Tris-Borat, siehe C.V) aufgetragen werden.

C.V : AGAROSEGELELEKTROPHORESE

V.1 : ELEKTROPHORESE-PUFFER

Tris-Acetat-Puffer:

40 mM Tris, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA,
mit Eisessig auf pH 7.8 einstellen;

Tris-Borat-Puffer:

90 mM Trisbase, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA
pH 8.3

V.2 : METHODE

In dieser Arbeit wurden ausschließlich vertikale Agarosegele gefahren. Die dazu verwendeten Kammern wurden nach der Vorschrift von Dr.Blohm (GBF Braunschweig) in unserem Institut nachgebaut.

Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit Bromphenolblau in Sucrose oder Glycerin versetzt. Dadurch werden einerseits die Probenlösungen schwerer als der umgebende Elektrophoresepuffer, so daß keine Vermischung stattfinden kann; zum anderen erlaubt die Farbmarkierung, die Wanderung der Proben während der Elektrophorese zu verfolgen.

Gespaltene DNA-Proben wurden grundsätzlich in Tris-Acetat Gelen gefahren. Die Verdauung mit Restriktionsenzymen und die Größenbestimmung der Fragmente ist in C.VI beschrieben.

Bei DNA-Rohlysaten (vergl. C.IV.2.1) wurde je nach Größe der darzustellenden Plasmide Tris-Acetat- (Plasmide < 20 kb) oder Tris-Borat-Puffer (Plasmide > 20 kb) für die Elektrophorese verwendet.

Agarosekonzentration, angelegte Spannung und Laufzeit sind abhängig von Art und Fragestellung des Experiments. Die gewählten Bedingungen sind den Legenden der einzelnen Gelab-

bildungen zu entnehmen.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele in einer EtBr-Lösung ca. 20-30 min gefärbt. Durch das Farbreagenz werden die DNA-Banden im UV-Durchlicht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) zur Fluoreszenz angeregt. Das so sichtbar gemachte DNA-Muster wird photographiert.

C.VI : RESTRIKTIONSANALYSE

VI.1 : SPALTUNG DER DNA

Die pro Spaltansatz erforderliche DNA-Menge richtet sich nach der Konzentration der DNA-Lösung und nach der Anzahl der durch die Verdauung entstehenden Fragmente.

Die einzusetzende Enzymkonzentration wurde durch Spaltung einer bekannten DNA (meist λ -DNA) mit verschiedenen Enzymverdünnungen ermittelt.

Zur Verdünnung der Enzyme wurde folgender Puffer verwendet:

10 mM Tris, 250 mM NaCl, 1 mM Dithiothreit,
50% Glycerin, pH 7.5

Die Verdauung von Plasmid-DNA, die über CsCl-EtBr-Gradienten (C.IV.1) isoliert und wie in C.IV.1.3 beschrieben aufbereitet wurde, erfolgte unter nachstehenden Bedingungen:

SmaI-Spaltung: 15 mM Tris/HCl, 15 mM KCl, 6 mM MgCl_2
pH 9.0; 25°C; 120 Minuten

HindIII-Spaltung: 10 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl_2 , 50 mM
NaCl, pH 7.5; 37°C; 60 Minuten

Die HindIII-Bedingungen wurden auch bei Reaktionen mit EcoRI, PstI und BamHI angewendet.

Für DNA-Lösungen, die direkt nach der "cleared lysate" Methode (C.IV.2.1) gewonnen wurden, mußten die Probenlösungen

durch Zugabe von $MgCl_2$ zum Reaktionsgemisch (Endkonzentration 16 mM) abgepuffert werden.

Durch kurzzeitiges Erhitzen der Proben auf $70^{\circ}C$ wurden die Reaktionen gestoppt. Im Falle von Doppelverdauungen erfolgte nach dieser Temperaturbehandlung die Nachverdauung mit dem zweiten Enzym.

Zur Auftrennung der Restriktionsfragmente wurden die Proben nach Zugabe von Bromphenolblau einer Agarosegelelektrophorese unterworfen (C.V).

VI.2 : GRÖSSENBESTIMMUNG DER FRAGMENTE

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente in der Gelelektrophorese ist direkt abhängig von ihrem Molekulargewicht. Daher kann die Länge eines unbekannten Spaltprodukts durch Vergleich mit der Laufstrecke von Fragmenten bekannter Größe errechnet werden.

Durch logarithmische Auftragung der Wanderungsstrecke gegen das Molekulargewicht wird für jedes Gel eine Eichkurve erstellt, die es erlaubt, die Größe der unbekannten Fragmente zu bestimmen.

Unter den üblichen Elektrophoresebedingungen ist ein solcher Vergleich nur in dem Bereich zwischen ca. 0.6 kb und 12 kb zuverlässig genau. Fragmente außerhalb dieser Größenklasse können in ihrer Länge nur relativ zu den Standardfragmenten abgeschätzt werden.

Als Längenmarkierungen zur Erstellung der Eichkurven wurden die EcoRI-Fragmente des Phagen P1 ($P1_E$, Bächli und Arber, 1977), die HindIII-Fragmente des λ -Wildtyps (λ_H) und die Bandenverteilung des λ -Genoms nach EcoRI/HindIII-Doppelverdauung (λ_{EH}) (Phillipsen und Davis, 1978) herangezogen.

Für die einzelnen Fragmente wurden folgende Längen angenommen (Angaben in kb):

λ_H : (1) 23.72
 (2) 9.46
 (3) 6.66
 (4) 4.26
 (5) 2.25
 (6) 1.96
 (7) 0.59

λ_{EH} : (1) 21.80
 (2) 5.24
 (3) 5.05
 (4) 4.21
 (5) 3.38
 (6) 1.96
 (7) 1.91
 (8) 1.62
 (9) 1.32
 (10) 0.93
 (11) 0.88
 (12) 0.59

$P1_E$: (1) 14.55	(11) 1.68
(2) 9.85	(12) 1.47
(3) 8.84	(13) 1.29
(4) 6.30	(14) 1.06
(5) 5.65	(15) 1.03
(6) 5.30	(16) 0.90
(7) 3.54	(17) 0.60
(8) 3.28	(18) 0.40
(9) 2.92	(19) 0.35
(10) 2.73	(20) 0.30

Die $P1/EcoRI$ -Fragmente (21) bis (25) sind hier nicht aufgeführt, da sie bei den gewählten Bedingungen in der Gelelektrophorese nicht in Erscheinung treten.

C.VII.: ELEKTRONENMIKROSKOPIE

VII.1 : ERZEUGUNG VON DNA-HOMODUPLICES (Burkardt et al., 1979a,b)

Für Homoduplexexperimente sollte die DNA-Konzentration der Probenlösungen zwischen 10 μg und 100 $\mu\text{g/ml}$ liegen.

Die DNA-Lösung wird mit Formamid (FNH_2) und 1 M Phosphat-

puffer, pH 7.0, auf eine Endkonzentration von 100 mM Phosphat und 50% FNH_2 -gebracht.

Zur Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturierung) wird die Probe 1.5 Minuten in einem Wasserbad gekocht.

Nach Zugabe von Natriumperchlorat (Endkonzentration 200 mM) inkubiert man die Probe für 5 bis 30 Minuten (je nach erwünschtem Hybridisierungsgrad) bei 40°C (Renaturierung).

VII.2 : SPREITUNG DER DNA-MOLEKÜLE

Die Spreitungstechnik mit Cytochrom c (Cyt c) beruht auf einer abgewandelten Methode von Kleinschmidt (Kleinschmidt und Zahn, 1959; Kleinschmidt, 1968; Burkardt et al., 1979a,b).

Cyt c bildet an der Phasengrenze Luft/Wasser einen monomolekularen Film aus basischem Protein, der die DNA adsorbiert, entfaltet und stabilisiert.

VII.2.1: Spreitung einzelsträngiger DNA

4 μl der in VII.1 präparierten DNA-Lösung werden mit 6 μl 1 mM EDTA und 10 μl FNH_2 versetzt. 16 μl dieses Ansatzes vermischt man mit 4 μl 0.5 M Tris/HCl, pH 8.5, und 0.4 μl Cyt c-Lösung (5 mg/ml H_2O).

Diese Lösung wird über eine schräge Glasrille auf die Unterphase (30% Formamid, 10 mM Tris/HCl, 1 mM Na_2EDTA , pH 8.7) aufgetragen. Der sich ausbreitende Cyt c-Film wird mit einem parlodionbeschichteten Kupfernetz abgenommen und anschließend kontrastiert (siehe VII.3).

VII.2.2: Spreitung doppelsträngiger DNA-Moleküle (Droplet-Technik)

Die Stammlösung setzt sich zusammen aus

2.56 ml aqua bidest

0.30 ml 2 M NH_4Ac -Puffer, pH 7.0, 0.01 M EDTA

0.08 ml Cytochrom c, 0.01%ig in H_2O

0.49 ml dieses Gemisches werden mit 5-10 μl DNA-Lösung (Konzentration ca. 10 mg/ml) versetzt. Von dieser Mischung setzt man mehrere Tropfen auf eine hydrophobe Oberfläche und läßt sie ca. 60 Minuten stehen.

Mit einem parlodionbeschichteten Kupfernetz nimmt man den Cytochromfilm mit der anhaftenden DNA ab und kontrastiert nach der in VII.3 beschriebenen Methode.

VII.3 : KONTRASTIERUNG DER DNA-MOLEKÜLE (Burkardt et al., 1979a, 1979b)

Die in VII.2.1 und VII.2.2 erhaltenen Objektträger werden zur positiven Kontrastierung der DNA in Uranylacetatlösung (0.1 mM in 90% Äthanol, 30 sec) getaucht und in 90%igem Äthanol (10 sec), danach in Isopentan (10 sec) gewaschen. Nach dem Trocknen schließt sich eine Negativkontrastierung durch Rotationsverdampfung, zuerst mit Pt/Ir, anschließend mit Kohle, an.

VII.4 : AUSWERTUNG

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen werden über einen Projektor vergrößert und die Konturlänge der dargestellten DNA-Moleküle mit einem Längenmeßgerät ermittelt.

Der Umrechnungsfaktor errechnet sich über einen internen Standard oder über einen Gitterstandard, der bei definierter Vergrößerung mitfotographiert wird.

Das Gitternetz wird um den gleichen Faktor vergrößert wie die zu untersuchenden DNA-Moleküle. Die Konturlängen der Gitterkanten werden über das Längenmeßgerät bestimmt. Da die tatsächlichen Gitterabstände bekannt sind, ergibt der Vergleich der gemessenen Konturlängen die wahre Länge der DNA-Moleküle.

Bei einem internen Standard handelt es sich um kleine Plasmeide mit bekannter Moleküllänge, die bei der Präparation den DNA-Proben zugesetzt werden. Die Konturlänge des internen Standards wird gemessen und mit den Konturlängen der Proben-DNA verglichen. Daraus errechnet sich die tatsächliche Länge der untersuchten DNA.

C.VIII : GENEXPRESSION IN VIVO

VIII.1 : ANZUCHT UND ISOLIERUNG VON MINIZELLEN

Anzucht:

Der plasmidtragende Minizellstamm wird selektiv in 250 ml LB-Medium bei 37°C bis zur Stationärphase (über Nacht) angezogen.

Ernte:

Die Bakterien werden durch Abzentrifugieren der Übernachtskultur (7000 rpm, 10 min, 4°C) sedimentiert und das Pellet wird in 10 ml M9-Puffer sorgfältig resuspendiert.

Reinigung der Minizellen:

Die Abtrennung der Minizellen erfolgt durch Sedimentation der Zellen in einem Sucrosegradienten (10-30 % Sucrose in M9-Puffer). Die Minizellen sinken bei den gewählten Bedingungen auf Grund ihrer geringeren Schwere nicht zu Boden, sondern bilden eine diffuse Bande im unteren Drittel des Gradienten, während die großen Elternzellen pelletieren.

Am einfachsten werden 10-30%ige Sucrosegradienten durch folgende Methode hergestellt: 30 ml einer 20%igen Sucroselösung (in M9-Puffer) werden in Nitrocellulose-Zentrifugationsbecher eingefroren und langsam wieder aufgetaut. Durch diesen Prozess stellt sich automatisch ein Gradient von 10-30% ein.

Im ersten Reinigungsschritt werden die resuspendierten Bakterien (10 ml) auf zwei Gradienten aufgeteilt. Die Sucrosegradienten werden mit je 5 ml der Suspension überschichtet und für 20 Minuten bei 5000 rpm in einem Ausschwingrotor bei 4°C zentrifugiert.

Die Minizellfraktionen werden von oben mit einer 10 ml-Spritze abgezogen, gesammelt, pelletiert (13000 rpm, 10 min, 4°C) und in 5 ml M9-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wird erneut auf einen Sucrosegradienten aufgetragen und wie oben zentrifugiert.

Diese Reinigungsschritte werden solange wiederholt, bis bei der Sucrosegradienten-Zentrifugation kein Pellet (Elternzellen!) mehr auftritt (ungefähr 2-3x).

Nach dem letzten Gradienten werden die Minizellen wieder bei 13000 rpm sedimentiert, zweimal in M9-Puffer gewaschen und in soviel M9-Medium aufgenommen, daß die Konzentration $2-3 \times 10^{10}$ Minizellen/ml beträgt. Durch Zugabe von Cycloserin ($20 \mu\text{g/ml}$) wird das Wachstum von eventuell noch vorhandenen elterlichen Zellen verhindert.

Sollen die Minizellen aufgehoben werden, wird das Pellet in einem definierten Volumen M9-Medium, das 30% Glyzerin enthält, resuspendiert. Diese Mischung wird in 1 ml-Portionen in flüssiger Luft aufbewahrt. Nach dem Auftauen werden die Zellen abzentrifugiert und können wie frisch isolierte Minizellen weiterverarbeitet werden.

VIII.2 : RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER PLASMIDCODIERTEN PROTEINE (Levy, 1974; Reeve, 1977, 1978)

VIII.2.1 : Einbau von L-(^{35}S)Methionin

Je $500 \mu\text{l}$ der Minizellsuspension werden mit $400 \mu\text{l}$ MAM/cs ("methionine assay" Medium/Cycloserin $20 \mu\text{g/ml}$) vermischt. Nach Zugabe von $5 \mu\text{Ci}$ L-(^{35}S)Methionin ($300-800 \text{ Ci/mMol}$) wird der Ansatz 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die Synthese plasmidcodierter Proteine, die durch Einbau der radioaktiven Aminosäure markiert sind.

VIII.2.2 : Lyse der Minizellen

Die Minizellen werden sedimentiert (Eppendorfsentrifuge, 90 sec) und der Überstand wird quantitativ abgezogen. Das Pellet wird im trockenen Zustand gelöst (Vortex) und in $50 \mu\text{l}$ Reaktionspuffer (sample buffer, siehe C.VIII.3) aufgenommen. Durch kurzzeitiges Erhitzen auf 100°C (5 min) lysieren die Minizellen und setzen die radioaktiv markierten Proteine frei.

VIII.2.3 : Bestimmung der eingebauten Radioaktivität

Um die Effektivität des ^{35}S -Einbaus in den neu-synthetisierten Proteinen zu testen, werden $5 \mu\text{l}$ der markierten Probe mit 1 ml kalter Trichloressigsäure (TCA, 5%) vermischt. Da die Konzentration der radioaktiven Proteine

Zur Ausfällung zu gering ist, wird der Probe ein Copräzipitat (Rinderserumalbumin oder Lysozym) zugesetzt. Das TCA-fällbare Material wird auf Nitrocellulose-Filter gebunden und die Zählrate bestimmt. Dazu werden die getrockneten Filter in Szintillationsgläsern mit 5 ml Toluol und PPO (5 g/l Toluol) gegeben und die radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm = counts per minute) bestimmt.

VIII.3 : POLYACRYLAMID(PAA)-GELELEKTROPHORESE UND FLUOROGRAPHIE (Reeve, 1977)

VIII.3.1: Die Gelapparatur

Die in dieser Arbeit verwendete Vertikal-Apparatur wurde unserem Labor vom Max Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt. Sie wurde dort nach einer etwas modifizierten Vorschrift von W. Studier (1973) gebaut.

VIII.3.2: Puffer und andere Lösungen

Diese Puffer werden grundsätzlich mit ultrapuren Chemikalien und bidestilliertem Wasser angesetzt.

Elektrophoresepuffer (reservoir buffer) 10x:

30.2 g Tris/Base, 144.0 g Glycin pro Liter H_2O , filtrieren, vor Gebrauch Zugabe von SDS (0.1%) in 1x Puffer;

Sammelgelpuffer (stacking gel buffer) 4x:

61 g Tris/Base in H_2O lösen, mit HCl auf pH 6.8 einstellen und auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml bringen, filtrieren;

Trenngelpuffer (separating gel buffer) 4x:

182 g Tris/Base wie oben mit Wasser und HCl auf pH 8.8 einstellen, Endvolumen 1000 ml, filtrieren; fast

Reaktionspuffer (sample buffer):

pro 1 ml: 0.125 ml stacking gel buffer
0.300 ml 10% SDS
0.100 ml 100% Glycerin
0.050 ml Mercaptoäthanol
0.425 ml H₂O

Acrylamid-Bis-Stammlösung:

3% w/v Acrylamid, 0.8% w/v Bisacrylamid in H₂O lösen,
filtrieren, dunkel und kalt aufbewahren;

Glycerin:

50% Glycerin in Wasser, filtrieren;

SDS:

10% w/v in Wasser, filtrieren;

Ammoniumpersulfat (NH₄)₂S₂O₈:

10% in Wasser jeweils frisch ansetzen, filtrieren;

Bromphenolblau:

0.2% w/v in Wasser;

TEMED:

unverdünnt

SDS-Polyacrylamid-Lösungen

Trenngel: Es werden zwei Lösungen angesetzt (14%ig und 20%ig),
die dann beim Gießen des Gradientengels (VIII.3.3)
in einem Gradientenmischer kontinuierlich ver-
mengt werden.

Folgende Angaben gelten für 1 Trenngel, Polymeri-
sationsdauer 45-60 Minuten.

	14%	20%
50% Glycerin	0.33 ml	1.33 ml
separating gel buffer (4x)	5.00 ml	5.00 ml
Acrylamid-Bis, 4°C	9.30 ml	13.30 ml
H ₂ O bidest	5.00 ml	-----
entgasen		
TEMED, 4°C	1.70 µl	0.60 µl
SDS, 10%	0.20 ml	0.20 ml
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 10%	0.15 ml	0.15 ml

Sammelgel: Mengen für 1 Gel, Polymerisationszeit 6-8 Minuten.

H ₂ O	5,80 ml
stacking gel buffer, 4x	2,50 ml
Acrylamid-Bis, 4°C	1,90 ml
entgasen	
TEMED, 4°C	7,50 µl
SDS, 10%	0,10 ml
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 10%	0,07 ml

VIII.3.3: Das Trenngel (separating gel)

Die nach oben beschriebener Vorschrift angesetzten Polyacrylamid-Lösungen (14% und 20%) werden in einen Gradientenmischer gefüllt, der über eine Peristaltikpumpe mit der Gelkammer verbunden ist. Die Mischung wird langsam von unten her in die Glaskammer gepumpt, so daß sich ein kontinuierlicher Gradient von 14% (oben) bis zu 20% (unten) ausbildet. Der obere Gelrand wird durch Einsetzen eines Spacers geglättet. Gleichzeitig wird durch diesen Spacer ein Hohlraum im Trenngel vorgeformt, der zur Aufnahme des Sammelgels vorgesehen ist.

Nach 45-60 Minuten ist das Gel durchpolymerisiert. Der Spacer wird vorsichtig entfernt und der entstandene Hohlraum gut gesäubert.

VIII.3.4: Das Sammelgel (stacking gel)

Die Gelkammer mit dem Trenngel wird vertikal in die Elektrophoreseapparatur, deren untere Kammer mit Reservoir Puffer (1x mit SDS) gefüllt ist, eingesetzt.

Die Lösung für das Sammelgel wird nach VIII.3.2 vorbereitet und mit einer Pipette in den oberen Hohlraum eingefüllt. Durch Einsetzen eines Plastikammes in das noch flüssige Gel werden Taschen zur Aufnahme der Proben ausgespart. Nach Polymerisation des Sammelgels (ca. 8 Minuten) wird der Kamm vorsichtig entfernt und die obere Kammer der Elektrophoreseapparatur ebenfalls mit Reservoir-Puffer gefüllt.

VIII.3.5: Beladen des PAA-Gels und Elektrophorese

Das Probenvolumen, das in die Taschen des stacking gels eingefüllt wird, richtet sich nach der in VIII.2.3 ermittelten Zählrate. Um eine gute Auftrennung der Polypeptide zu erzielen, sollen im allgemeinen nicht mehr als 25 µl pro Spur aufgetragen werden. Von Vorteil ist es auch, wenn die Probenvolumina in den verschiedenen Spuren eine vergleichbare Aktivität besitzen (gegebenenfalls mit Reaktionspuffer verdünnen).

Das Gel läuft nach Anlegen einer Spannung von 150 V etwa 14-16 Stunden.

VIII.3.6: Aktivierung des Polyacrylamidgels (Fluorographie)

Das Gel wird nach der Elektrophorese vorsichtig aus der Glaskammer entnommen und 2 x 30 Minuten unter langsamem Schütteln mit DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelt. Anschließend wird es für 3 Stunden in einer Lösung aus DMSO und PPD (30 g PPD in 120 ml DMSO) langsam bewegt.

Nach 2maligem Waschen in Wasser (jeweils 30 Minuten) legt man das Gel auf Whatman-Filterpapier, überdeckt es mit einer durchsichtigen Folie und entwässert auf einem heizbaren Vakuumtrockengerät.

Das getrocknete Gel wird auf einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat R-Film XR5) gelegt und bei -70°C exponiert.

Nach Ablauf der Belichtungszeit (2 Tage bis mehrere Wochen, je nach Radioaktivität der aufgetragenen Proben) wird der Röntgenfilm nach Vorschrift entwickelt.

D : E R G E B N I S S E

D.I : ISOLIERUNG VON RP4-MUTANTEN AUS RHIZOBIUM LUPINI

I.1 : NACHWEIS DER RP4-MUTANTEN IN RHIZOBIUM LUPINI

Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß das Plasmid RP4 in *R.lupini*-Stämmen (Heumann, 1968; Heumann et al., 1971, 1973) mit großer Häufigkeit verloren geht bzw. phänotypischen Veränderungen unterworfen ist (Pühler, 1976). Mutationen, die die Ap-Resistenz, die Km-Resistenz oder die Transferfähigkeit des Plasmids betreffen, sind in beliebiger Kombination zu beobachten. Dabei verhalten sich mutierte Plasmid genauso instabil wie das Wildtyp-Plasmid.

Da Verlust und Mutationen im Prozentbereich auftreten, lassen sie sich durch einfache Stempelmethoden nachweisen.

I.1.1 : Nachweis von Resistenz- und Plasmidverlust

R.lupini-Stämme, die RP4 oder RP4-Mutanten tragen, werden über Nacht ohne Selektion in Flüssigmedium angezogen und auf antibiotikafreien bzw. tetracyclinhaltigen Platten ausgespatelt. Die Einzelkolonien werden in einem definierten Muster auf Vollmedium- bzw. Tetracyclinagar übertragen und nach Anwachsen der Kolonien durch Überstempeln auf die entsprechenden Antibiotikaplatten auf Ap-, Km- und Tc-Resistenz getestet (Tabelle 1).

			Anzahl resisten- ter Kolonien auf				PLASMID VERLUST (%)	RESI- STENZ VERLUST (%)
SELEKTION	STAMM	PLASMID MARKER	PA +					
			PA	Ap	Km	Tc		
ohne Selektion	1-491(RP4)	Ap,Km,Tc	54	44	45	45	17.0	1.8
	M137-12	Ap,Km,Tc	76	68	70	70	8.0	3.0
	M137-13	Ap,Km,Tc	120	114	116	118	1.6	5.0
	M137-5.1	Tc	50	0	0	42	16.0	0
	M137-2	Ap,Km	100	93	0	94	6.0	1.0
Selektion auf Tc	1-491(RP4)	Ap,Km,Tc	30	30	29	30	—	3.3
	M137-13	Ap,Km,Tc	46	45	46	46	—	2.0
	M137-5	Km,Tc	18	0	14	18	—	22.0
	M137-2	Ap,Tc	142	70	0	142	—	50.0

Tab.1: Verlust- und Mutationsfrequenz von RP4 und RP4-Mutanten in *Rhizobium lupini*

Das Fehlen aller ursprünglich vorhandenen Resistenzmarker signalisiert den Verlust des gesamten Plasmids; Einzelkolonien mit neu auftretender Antibiotikasensitivität beherbergen ein mutiertes RP4-Plasmid.

Ein Vergleich der Zahlen in Tabelle 1 zeigt, daß RP4-Mutanten zum Teil noch eine wesentlich höhere Mutationsfrequenz aufweisen als das Wildtyp-Plasmid.

I.1.2 : Nachweis von RP4-Transfermutanten in Rhizobium lupini

Auch die Entstehung von RP4-Transfermutanten, die die Fähigkeit zur Selbstübertragung verloren haben, ist in *R.lupini* ein häufiges Mutationseignis, das keine spezielle Selektion erfordert.

Zum Nachweis der Transfermutanten wurde ein Stempelverfahren verwendet, welches ermöglicht, den RP4-Transfer von Einzelkolonien zu testen.

Auxotrophe, plasmidtragende *R.lupini*-Stämme werden in Flüssigmedium angezogen und auf Tetracyclinagar zu Einzelkolonien ausgespatelt. Die auxotrophen, Tc^r Kolonien werden auf einen prototrophen *R.lupini*-Rezipientenrasen auf tetracyclinhaltigem Minimalmedium überstempelt. Wachstum der Rezipienten ist nur nach Erwerb des Tc -Resistenz vermittelnden RP4-Plasmids möglich (Burkardt, 1972; Pühler et al., 1974).

Das Fehlen von Koloniewachstum auf der Rezipientenplatte spiegelt wider, daß an dieser Stelle kein Plasmidtransfer erfolgte. Die entsprechende Donorkolonie beherbergt demnach ein RP4-Plasmid mit verändertem Transferverhalten.

Mit dieser Methode wurden sowohl von RP4 als auch von RP4-Resistenzmutanten transferdefekte Derivate nachgewiesen.

I.2 : STABILISIERUNG DER RP4-MUTANTEN AUS RHIZOBIUM LUPINI DURCH ÜBERTRAGUNG AUF ESCHERICHIA COLI

Die hohe Eliminierungs- und Mutationsrate von RP4 und RP4-Mutanten in *R.lupini* macht es unmöglich, einheitliche Plasmid-DNA, wie sie z.B. für eine molekularbiologische Analyse erforderlich ist, aus diesen Stämmen zu isolieren.

Zur Stabilisierung wurden die RP4-Mutanten nach *E.coli* transferiert, wo sie über viele Generationen unverändert weitervererbt werden.

I.2.1 : Transfer von RP4-Resistenzmutanten durch Konjugation

Plasmidtransfer von *R.lupini* nach *E.coli* bereitet keine Schwierigkeiten, wenn Kreuzungen auf Nitrocellulose-Filtern über Nacht durchgeführt werden.

Um eine Verminderung der Transferfrequenz durch Restriktion zu verhindern, wurde als Rezipient der restriktionsnegative Stamm *E.coli* C bevorzugt. Unter diesen Bedingungen werden RP4-Mutanten mit einer Rate von ungefähr 10^{-2} nach *E.coli* transferiert.

Als Beispiel soll hier die Übertragung des Km^S Plasmids von *R.lupini* 1-491(RP4: Km^S): Sm^r (Stammbezeichnung M137-6) nach *E.coli* C: Nx^r gezeigt werden.

Die beiden Elternstämme wurden nach der in C.III.1 beschriebenen Methode auf Nitrocellulose-Filtern über Nacht bei $30^{\circ}C$ gekreuzt. Nach Abschwemmen der Filter wurde eine Verdünnungsreihe auf PA+Nx+Tc-Platten ausgespatelt und der Titer der Tc-resistenten Transkonjuganten bestimmt. Die in Tabelle 2 angegebene Transferfrequenz ist auf die Anzahl Tc^r Donor-

KREUZUNG		Titer der Tc^r		TRANSFER RATE	Anzahl resistenten Kolonien auf			
DONOR	REZIPIENT	Rezipienten	Donoren		PA +			PA
					Ap	Km	Tc	
1-491 (RP4: Km^S)	<i>E.coli</i> C	2.4×10^8	1.3×10^{10}	1.8×10^{-2}	48	Ø	50	50

Tab.2: Übertragung eines Km^S RP4-Plasmids von *R.lupini* 1-491: Sm^r
auf *E.coli* C: Nx^r

zellen im Kreuzungsgemisch bezogen, die durch Ausplattieren einer entsprechenden Verdünnungsstufe auf NB+Sm+Tc-Medium bestimmt wurde.

Beim Nachtesten der Tc^r Transkonjuganten ergab sich, daß nicht alle Rezipienten das ursprüngliche Plasmid erworben hatten; ein Teil der Kolonien zeigte keine Resistenz gegen Ampicillin. Die Erklärung dafür ist, daß während der Anzucht des Donorstammes das Km^s Plasmid in einigen Zellen eine weitere Mutation erfährt, die die Resistenz gegen Ampicillin betrifft, so daß auf einen Teil der Rezipienten eine Ap^s, Km^s Mutante übertragen wurde.

I.2.2 : Übertragung von RP4-Transfermutanten

Unter Anwendung der in I.1.2 beschriebenen Stempelmethode wurden *R.lupini*-Stämme mit verschiedenen RP4-Transfermutanten isoliert. Kreuzungsexperimente zeigten, daß in manchen Fällen noch ein reduzierter Plasmidtransfer nach *E.coli* stattfinden kann. Die RP4-Mutanten werden daher in zwei Klassen unterteilt: in transfernegative (Tra^-) und transferverminderte (Tra^v) Plasmide.

I.2.2.1: Transfernegative RP4-Mutanten

Zur Gruppe der transfernegativen RP4-Plasmide werden solche RP4-Mutanten gezählt, die von einem *R.lupini*-Donor weder nach anderen *R.lupini*-Stämmen noch nach *E.coli* durch Konjugation transferiert werden können. Zur Stabilisierung müssen sie durch Transformation auf geeignete *E.coli*-Stämme übertragen werden.

Eine transfernegative Mutante wurde z.B. aus M137-5.1 isoliert, einem Km^s Derivat des Stammes M137-5: Ap^s, Km^r, Tc^r . Stempeltransfer (vergl. I.2.1) und Filterkreuzungen (siehe C.III.1) ergaben, daß die verbliebene Tc-Resistenz weder nach anderen *R.lupini*-Stämmen noch nach *E.coli*-Rezipienten transferierbar war.

Während im Stamm M137-5 die Antibiotikaresistenzen ohne weiteres durch Konjugation auf *E.coli* übertragen werden konnten, mußte das transfernegative Plasmid aus M137-5.1

durch Transformation von E.coli C stabilisiert werden. Dazu wurde der R.lupini-Stamm M137-5.1 in Tetracyclinmedium bis zur Stationärphase angezogen, die Zellen durch Sarkosyl lysiert (siehe C.IV.2.1) und die Plasmidfraktion nach CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation (vergl. C.IV.3) isoliert.

Zur Transformation wurden 100 µl der aufbereiteten Plasmid-DNA mit 100 µl TCM und 200 µl kompetenter Rezipientenzellen vermischt und nach der in C.IV.2 angegebenen Vorschrift weiterbehandelt.

Die Selektion auf Tc^r Rezipienten ergab einen Titer von 2×10^2 Transformanten/ml.

Die transformierte Tc-Resistenz erwies sich auch innerhalb von E.coli als vollkommen transfernegativ. Die Übertragung auf andere E.coli-Stämme, wie CSH 51 und CSH 52, erfolgte durch P1-Transduktion (vergl.C.III.3).

I.2.2.2: Transferverminderte RP4-Mutanten

Die nach oben beschriebener Methode (D.I.1.2) isolierten RP4-Transfermutanten sind innerhalb der Art R.lupini nicht mehr transmissibel, zeigen aber zum Teil einen geringen Transfer von R.lupini nach E.coli.

Dieses Verhalten wurde für die meisten der isolierten Plasmide beobachtet. Solche Transfermutanten mit Resttransfer nach E.coli werden im folgenden zur Unterscheidung von transfernegativen Plasmiden als transfervermindert (Tra^v) bezeichnet.

a) Übertragung transferverminderter RP4-Plasmide nach E.coli

Verschiedene $RP4:Tra^v$ Mutanten wurden durch Konjugation nach E.coli C:Nx^r übertragen. Als Plasmiddonor diente der Sm^r R.lupini-Stamm 1-491. Die Kreuzungen wurden über Nacht bei 30°C auf Nitrocellulose-Filtern durchgeführt. Nach Abschwemmen der Filter wurde durch Ausspateln des Konjugationsgemisches auf PA+Nx+Tc-Platten die Anzahl Tc-resistenter Transkonjuganten ermittelt. Durch Aus-

plattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe auf NB+Sm+Tc-Agar wurde der Titer Tc^r R.lupini-Donorzellen in der Kreuzungssuspension bestimmt.

Das Verhältnis: Titer Tc^r Transkonjuganten / Titer Tc^r Donorzellen gibt die Rate an, mit der die Tetracyclin-resistenz des RP4-Plasmids transferiert wurde.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Überstempeln der Tc^r Rezipienten auf Antibiotikaplatten diente zum Nachweis der vollständigen Übertragung der RP4-Mutanten.

DONOR: R.lupini			Titer der Tc^r Rezipienten	Titer der Tc^r Donoren	TRANSFER RATE
Stamm	Resistenz Marker	Transfer in R.lupini			
M137-2	Ap, Tc	-	7.0×10^5	6.5×10^9	1.1×10^{-4}
M137-3	Km, Tc	-	1.5×10^6	7.5×10^9	2.0×10^{-4}
M137-4	Km, Tc	-	1.1×10^6	8.2×10^9	1.3×10^{-4}
M137-12	Ap, Km, Tc	-	5.0×10^5	9.5×10^9	5.2×10^{-5}
M137-13	Ap, Km, Tc	-	2.0×10^1	7.1×10^9	2.8×10^{-9}
M137-6	Ap, Tc	+	$> 1.0 \times 10^8$	9.5×10^9	$> 1 \times 10^{-2}$
M137-5.1	Tc	-	$\emptyset$	3.2×10^8	$\emptyset$

Tab.3: Konjugation zwischen RP4:Tra^v-tragenden R.lupini-Stämmen und E.coli C

Die Übertragungsfrequenz der transferverminderten RP4-Plasmide liegt deutlich niedriger (Faktor 10^2 bis 10^7) als die des transferpositiven Plasmids aus M137-6, das in diesem Versuch als positive Kontrolle diente.

Eine Transferrate von 10^{-2} , wie sie dieses Plasmid aufweist, entspricht der für RP4-Transfer zwischen R.lupini und E.coli üblichen Frequenz.

Als negative Kontrolle wurde eine Tra⁻ Mutante verwendet (vergl. I:2.2.1).

b) Verhalten der transferverminderten RP4-Mutanten in E.coli

Von Interesse war nun, ob die transferverminderten RP4-Mutanten innerhalb der Art E.coli transmissibel sind.

Zur Klärung dieser Frage wurden die in a) isolierten E.coli C (RP4:Tra^V)-Stämme mit dem Sm^r Rezipienten CSH 51 gekreuzt.

Die Konjugation wurde in Flüssigmedium durchgeführt (siehe C.III.1), nach 90 Minuten abgebrochen und der Titer der Tc^r Transkonjuganten bestimmt.

Die ermittelten Transferfrequenzen von 10⁻⁵ (vergl. Tab.4) liegen etwas niedriger als die unter diesen Bedingungen üblichen Raten für RP4-Transfer zwischen E.coli-Stämmen, sind aber durch das fehlende Modifikationssystem im Donor E.coli C leicht zu erklären. Dies ergibt sich auch aus dem Vergleich mit dem Kontrollplasmid aus M137-6, das in diesem Versuch trotz normaler Transfereigenschaften mit der gleichen Häufigkeit übertragen wird.

DONOR: E.coli C			Titer Tc ^r Rezipienten	Titer Tc ^r Donoren	TRANSFER RATE
Plasmid aus	Transfer in R.lupini	Transferrate R.lup.xE.coli			
M137-2	-	1.0x10 ⁻⁴	7.0x10 ³	6.1x10 ⁸	1.1x10 ⁻⁵
M137-3	-	2.0x10 ⁻⁴	6.0x10 ³	3.2x10 ⁸	1.8x10 ⁻⁵
M137-4	-	1.3x10 ⁻⁴	4.5x10 ³	5.2x10 ⁸	0.9x10 ⁻⁵
M137-12	-	5.2x10 ⁻⁵	3.0x10 ³	8.0x10 ⁷	3.7x10 ⁻⁵
M137-13	-	2.8x10 ⁻⁹	3.2x10 ³	5.0x10 ⁷	6.4x10 ⁻⁵
M137-6	+	> 1x10 ⁻²	8.5x10 ³	2.1x10 ⁸	4.0x10 ⁻⁵
M137-5.1	-	∅	∅	3.5x10 ⁸	∅

Tab.4: Übertragung transferverminderter RP4-Mutanten von E.coli C (Nx^r, r⁻, m⁻) nach CSH 51 (Sm^r)

In weiteren Versuchen wurden die isolierten CSH 51 (RP4:Tra^V)-Stämme als Donoren verwendet.

Die für diese Kreuzungen ermittelten Transferfrequenzen von durchschnittlich 10⁻⁴ entsprechen einem normalen RP4-Transfer bei gleichen Bedingungen (90 Minuten Konjugationszeit in Flüssigmedium).

Zusammenfassend ergibt sich, daß diese Art von RP4- Mutanten innerhalb von R.lupini keinen Transfer erkennen läßt,

von *R.lupini* nach *E.coli* einen zum Teil stark reduzierten Resttransfer aufweist und innerhalb von *E.coli* mit normaler Häufigkeit übertragen wird.

Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten wird in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Restriktionsanalyse der RP4:Tra^V Mutanten in Teil E.IV.3 dieser Arbeit gegeben.

I.3 : TRANSFORMATION VON E.COLI C MIT RP4-MUTANTEN DNA AUS RHIZOBIUM LUPINI

Das Prinzip der oben beschriebenen Versuche war, neue RP4-Mutanten in *R.lupini* nachzuweisen und zu isolieren, die dann aus Gründen der Stabilität auf *E.coli* übertragen wurden.

Eine andere Möglichkeit zur Gewinnung von neuen RP4-Resistenz- und Transfermutanten besteht darin, die gesamte Plasmid-DNA aus einem mutantentragenden *R.lupini*-Stamm zu isolieren, durch Transformation auf *E.coli* zu übertragen und die Rezipienten auf erworbene RP4-Marker zu testen.

Im Vordergrund des folgenden Versuchs stand die Isolierung von transfernegativen RP4-Mutanten.

Verschiedene mutantentragende *R.lupini*-Stämme wurden über Nacht in tetracyclinhaltigem Medium angezogen und mit Sarkosyl lysiert (vergl. C.IV.1.1.1).

Nach Isolierung der extrachromosomalen DNA durch CsCl-EtBr-Gleichgewichtszentrifugation (siehe C.IV.1.2) wurde die Plasmid-DNA entfärbt und ausgiebig gegen TE-Puffer dialysiert (C.IV.1.3).

Die Transformation wurde nach der in C.III.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Als Rezipient diente der Stamm *E.coli* C. Die auf Tetracyclinmedium selektierten Transformanten wurden hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften und ihrer RP4-Transferfähigkeit durch Stempelmethoden untersucht (Tabelle 5).

Die Untersuchung der Transformanten ergab eine große Heterogenität in Bezug auf die Eigenschaften der erworbenen Moleküle.

R.lupini 1-491		Titer der Tc ^r Transfor- manten	Markierungen der transformierten Plasmide in E.coli			
Stamm	Plasmid Marker		unverändert	AB ⁻	TRA ⁻	AB ⁻ TRA ⁻
M137-6	Ap, Tc, Tra ⁺	6.4x10 ²	Ap, Tc, Tra ⁺ (63%)	Tc, Tra ⁺ (31%)	Ap, Tc, Tra ⁻ (3%)	Tc, Tra ⁻ (3%)
M137-13	Ap, Km, Tc, Tra ^v	4.5x10 ²	Ap, Km, Tc, Tra ⁺ (25%)	∅	Ap, Km, Tc, Tra ⁻ (61%)	Km, Tc, Tra ⁻ (13%) Ap, Tc, Tra ⁻ (1%)
M137-7	Tc, Tra ⁺	6.3x10 ²	Tc, Tra ⁺ (45%)	∅	Tc, Tra ⁻ (55%)	∅
M137-13.1	Km, Tc, Tra ^v	3.7x10 ²	Km, Tc, Tra ⁺ (4%)	Tc, Tra ⁺ (38%)	Km, Tc, Tra ⁻ (54%)	Tc, Tra ⁻ (4%)

Tab.5: Transformation von E.coli C mit Plasmid-DNA aus R.lupini:
Resistenz- und Transfereigenschaften der von E.coli erworbenen Plasmide.
AB⁻ steht für das Fehlen einer Antibiotikaresistenz in E.coli im Ver-
gleich zum Resistenzmuster der RP4-Mutanten in R.lupini;
Tra⁻ bedeutet entsprechend den Verlust der Transferierbarkeit in Plas-
miden, die in R.lupini transferpositiv bzw. transfervermindert waren.
Die in Klammern angegebenen Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der
Transformanten mit Plasmiden solcher Markierung.

Die Erklärung dafür liegt in der hohen Mutationsrate der
RP4-Plasmide in R.lupini. Während der Anzucht des plasmid-
tragenden R.lupini-Stammes treten in einigen Zellen unter-
schiedliche Mutationsereignisse auf, die zum Teil Resistenz-
eigenschaften, zum Teil die Transferierbarkeit der RP4-Mole-
küle eliminieren. Die aus dieser Kultur isolierte Plasmid-
DNA beinhaltet daher verschiedene RP4-Mutanten, die durch
Transformation getrennt und sichtbar gemacht werden können.

I.4 : HERKUNFT UND EIGENSCHAFTEN DER ISOLIERTEN UND UNTER- SUCHTEN RP4-MUTANTEN

Nach Übertragung auf E.coli zeigen die RP4-Mutanten über
viele Generationen hinweg keine weiteren phänotypischen
Veränderungen (vergl. D.IV.1), so daß im Prinzip erst
zu diesem Zeitpunkt eine definitive Nomenklatur möglich war.
Dabei wurden z.T. die Bezeichnungen von Pühler (1976) in
dieser Arbeit übernommen.

Für Mutanten, die primär durch ein verändertes Resistenzspektrum auffielen, gilt folgende Nomenklatur:

$Ap^S Km^r Tc^r$: RP4-2

$Ap^r Km^S Tc^r$: RP4-3

$Ap^S Km^S Tc^r$: RP4-5

Unabhängig voneinander isolierte Mutanten gleichen Phänotyps sind mit zusätzlichen Nummern versehen (z.B. RP4-2.1, RP4-2.2, RP4-2.3).

Die ursprünglich als transfervermindert isolierten Mutanten erhielten willkürlich die Bezeichnung RP4-12 und RP4-13. Die davon abgeleiteten Resistenzmutanten werden durch Anhängen der entsprechenden Ziffern ($Ap^S = -2$, $Km^S = -3$, $Ap^S Km^S = -5$) gekennzeichnet (z.B. RP4-13.2).

In Tabelle 6 sind die in folgenden Kapiteln untersuchten RP4-Mutanten mit ihrem Resistenz- und Transferverhalten zusammengestellt.

Plasmid- bezeichnung	Resistenz- markierungen	Transferier- barkeit in R. lup.	E. coli	Entstehung in	Isolierung R. lup. Stamm	Methode
RP4-2.1	Ap ^s Km ^r Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4)	M137-3	I.2.1
RP4-2.2	Ap ^s Km ^r Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4)	M137-4	I.2.1
RP4-2.3	Ap ^s Km ^r Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4)	M137-5	I.2.1
RP4-3.1	Ap ^r Km ^s Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4)	M137-2	I.2.1
RP4-3.2	Ap ^r Km ^s Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4)	M137-6	I.2.1
RP4-5.1	Ap ^s Km ^s Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4-2.1)	M137-3	I.2.1
RP4-5.2	Ap ^s Km ^s Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4-3.2)	M137-6.1	I.2.1
RP4-5.3	Ap ^s Km ^s Tc ^r	Tra ⁺	Tra ⁺	1-491(RP4-3.2)	M137-6.2	I.2.1
RP4-5.4	Ap ^s Km ^s Tc ^r	Tra ⁻	Tra ⁻	1-491(RP4-2.3)	M137-5.1	I.2.2.1
RP4-5.8	Ap ^s Km ^s Tc ^r	Tra ⁺	n.t.	1-491(RP4)	n.i.	n.i.
RP4-5.81	Ap ^s Km ^s Tc ^r	n.t.	Tra ⁺	1-491(RP4-5.8)	M137-7	I.3
RP4-5.82	Ap ^s Km ^s Tc ^r	n.t.	Tra ⁻	1-491(RP4-5.8)	M137-7	I.3
RP4-12	Ap ^r Km ^r Tc ^r	Tra ^v	Tra ⁺	1-491(RP4)	M137-12	I.2.2.2
RP4-13	Ap ^r Km ^r Tc ^r	Tra ^v	Tra ⁺	1-491(RP4)	M137-13	I.2.2.2
RP4-13.1	Ap ^r Km ^r Tc ^r	n.t.	Tra ⁻	1-491(RP4-13)	M137-13	I.3
RP4-13.2	Ap ^s Km ^r Tc ^r	n.t.	Tra ⁻	1-491(RP4-13)	M137-13	I.3
RP4-13.5	Ap ^s Km ^s Tc ^r	Tra ^v	Tra ⁺	1-491(RP4-13)	M137-13.1	I.2.2.2

Tab. 6: Herkunft und Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten RP4-Resistenz- und Transfermutanten

n.t. = nicht untersucht
n.i. = nicht isoliert

D. II : NACHWEIS DES INSERTIONSELEMENTES ISR1 IN DEN RP4-MUTANTEN

Vorbemerkung:

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß in zwei von Spitzbarth (1978) untersuchten RP4-Mutanten Insertionen nachweisbar sind, die zum Teil gemeinsame Eigenschaften aufweisen.

Die Fragen, die sich aus diesem Ergebnis ableiten, sind unter anderem folgende:

1. Sind alle RP4-Mutanten, die in *R. lupini* auftreten, durch Insertionen gekennzeichnet?
2. Bis zu welchem Grad zeigen die gefundenen Insertionen Übereinstimmung?
3. An welchen Positionen des RP4-Moleküls treten Insertionen auf?
4. Auf welche Art führen diese Insertionen zum Verlust von Genfunktionen?

Zur Beantwortung dieser Fragen bietet sich als Untersuchungsmethode die Restriktionsanalyse an.

Da Restriktions-Endonucleasen nur an spezifischen Stellen einer DNA schneiden, wird ein Plasmid von einem bestimmten Restriktionsenzym immer in definierte Bruchstücke zerlegt, die in der Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge wandern und ein für das Plasmid charakteristisches Bandenmuster ergeben.

Treten in der Plasmid-DNA Mutationen durch Insertionen oder Deletionen auf, werden diese Veränderungen durch Verlängerung bzw. Verkürzung eines Fragments, oder durch das Auftreten neuer bzw. Fehlen ursprünglich vorhandener Spaltstellen sichtbar gemacht.

Das Auflösungsvermögen der Agarose-Gelelektrophorese ist unter anderem abhängig von der gewählten Agarosekonzentration. Zur Darstellung kleiner Fragmente empfiehlt sich eine hohe Agarosekonzentration (1.2 - 1.3%), während durch

schwachprozentige Gele (0.6 - 0.7%) im Zusammenhang mit einer langen Laufzeit eine bessere Auftrennung der großen Spaltstücke erzielt wird.

Agarosekonzentration und Laufbedingungen variieren daher und sind den verschiedenen Abbildungen zu entnehmen.

In einigen Fällen wurden zur Aufklärung von Plasmidstrukturen oder zur Absicherung restriktionsanalytischer Ergebnisse elektronenmikroskopische Methoden, wie Homo- und Heteroduplex-Experimente, herangezogen.

Sowohl für die Restriktionsanalyse als auch für elektronenmikroskopische Untersuchungen ist eine homogene Plasmidfraktion erforderlich. Wegen der hohen Mutationsrate der RP4-Mutanten in *R. lupini* führt die Isolierung von Plasmid-DNA aus diesen Stämmen nie zu einer einheitlichen Plasmidpopulation. Dies kommt in dem Transformationsversuch des Kapitels I.3 klar zum Ausdruck.

Die für die folgenden Untersuchungen verwendete Plasmid-DNA wurde daher ausschließlich aus *E. coli*-Stämmen isoliert. Die durch Restriktionsanalyse aufgestellten physikalischen Karten stellen also nur "Momentaufnahmen" dar, die die Struktur des Moleküls zum Zeitpunkt der Übertragung auf *E. coli* widerspiegeln.

II.1 : PHYSIKALISCHE UND GENETISCHE KARTE DES RP4-PLASMIDS

Eine Restriktionskartierung von Plasmidveränderungen ist nur möglich im Vergleich mit der ursprünglichen Molekülstruktur.

Die folgenden Fragmentanalysen der RP4-Mutanten basieren auf der in Abb.1 gezeigten Karte des RP4-Plasmids.

Die eingetragenen Restriktionsstellen wurden zum großen Teil von Spitzbarth (1978) übernommen. Anordnung und Position der Spaltstellen stimmen im wesentlichen mit denen überein, die von Grinstead et al. (1977), DePicker et al. (1977) und Meyer et al. (1977) angegeben werden.

Die Lokalisation der Resistenzdeterminanten und der Transferregionen wurde von Figurski et al. (1976), Stanisich und Bennett (1976), Holloway (1979) und Barth (Barth und Grinter, 1977a, 1977b; Barth et al., 1978; Barth, 1979) übernommen und auf die Restriktionskarte des RP4-Plasmids übertragen.

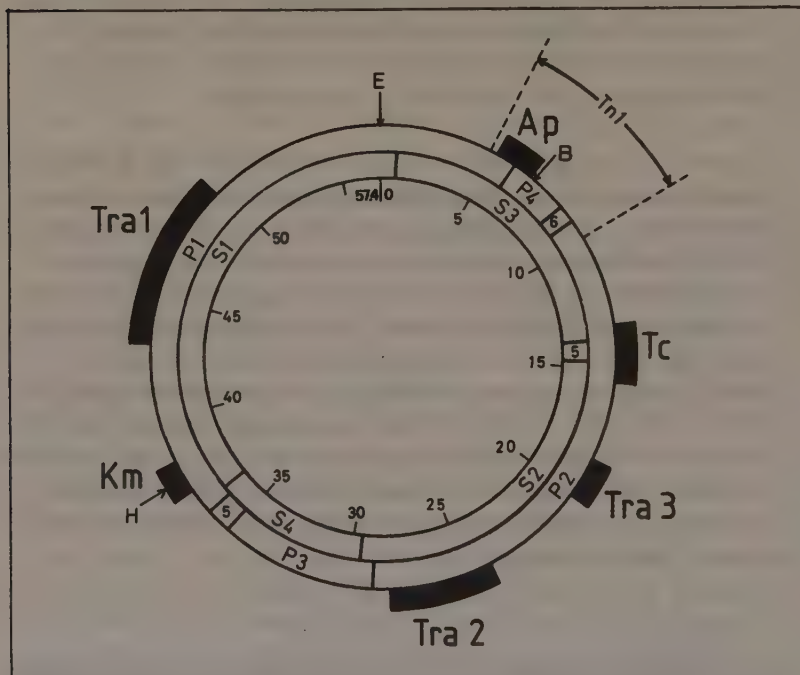
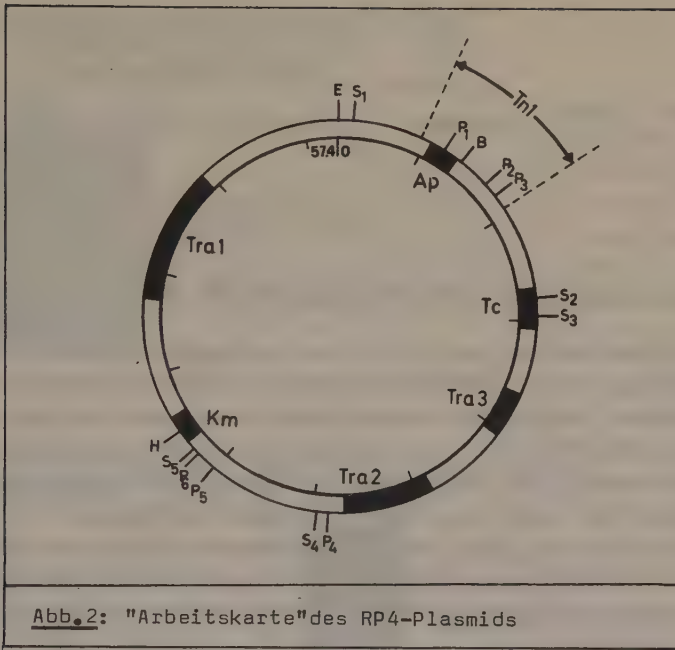


Abb.1: Physikalische und genetische Karte des RP4-Plasmids.

Der Karte liegt eine RP4-Länge von 57.4 kb (= 19.1 μ m) (innere Einteilung) zu Grunde (Burkardt et al., 1979a,b). Ap, Km, Tc bezeichnen die Genregionen, die für die Resistenz gegen Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin codieren; die Gene, die für den Plasmidtransfer verantwortlich sind, werden mit Tra1, Tra2 und Tra3 bezeichnet. Das Ampicillin-Transposon Tn1 ist mit einer Länge von 4.8kb angegeben (Heffron et al., 1975a,b). Die eingezeichnete Lage resultiert aus elektronenmikroskopischen Messungen (Simon, 1980).

Die zwei konzentrischen Kreise geben Anordnung und Länge der bei Verdauung mit SmaI (S, innerer Ring) und PstI (P, äußerer Kreis) auftretenden Fragmente an. Die jeweils nur einmal vorhandenen Schnittstellen für die Enzyme EcoRI (E), HindIII (H) und BamHI (B) sind durch Pfeile markiert.



Um die Interpretation der Spaltmuster zu erleichtern, wird in dieser Arbeit auf eine vereinfachte "Arbeitskarte" des RP4-Plasmids Bezug genommen (Abb. 2), in der die mehrfach vorhandenen Erkennungsstellen für die Enzyme PstI und SmaI mit Nummern gekennzeichnet sind.

Die in den RP4-Mutanten auftretenden Veränderungen werden in physikalischen Karten durch folgende Symbole dargestellt:

Xy : neu inserierte Erkennungsstelle für Enzym X

==== : Deletion von RP4-DNA



: Insertion ohne Angabe des genauen Integrationsortes



: Insertion mit Bezeichnung
der genauen Integrations-
stelle (Pfeilspitze)

: nicht exprimierte Genfunktion

II.2 : MOLEKULARE STRUKTUR DER RP4-MUTANTEN

In diesem Kapitel soll der Frage nachgegangen werden, wodurch sich RP4-Mutanten prinzipiell vom RP4-Plasmid unterscheiden. Dazu wurden verschiedene Einzelkolonien des Stammes 1-491(RP4), die durch spontan auftretende Antibiotikasekretivität oder durch Veränderungen der RP4-Transfereigenschaften auffielen, isoliert. Nach Übertragung der Plasmide auf *E.coli* wurde die extrachromosomale DNA nach der in C.IV.1 beschriebenen Methode gewonnen und mit Hilfe der Restriktionsanalyse auf Veränderungen der molekularen Struktur getestet.

II.2.1 : Ap^S RP4-Mutanten

Drei voneinander unabhängig isolierte Ap^S Mutanten sollen hier vorgestellt werden.

Die gereinigte, ungespaltene Plasmid-DNA bandiert im Agarosegel an gleicher Position wie das Wildtyp-Plasmid; die Mutanten besitzen also in etwa RP4-Länge.

Im Restriktionsverhalten unterscheiden sich die phänotypisch identischen Mutanten allerdings nicht nur vom RP4-Plasmid sondern auch untereinander.

Plasmid RP4-2.2

SmaI- und PstI-Verdauungen dieser Mutante ergeben, im Vergleich mit dem RP4-Plasmid, deutliche Veränderungen, die im Bereich des Ampicillin-Transposons Tn1 lokalisiert werden können. Die Vergrößerung des SmaI-Fragmentes S3 deutet auf zusätzliche DNA in dieser Region hin (Abb.3a, Spur 2). Durch Nachverdauung des SmaI-Ansatzes mit PstI wird ein

Verdauungsmuster des Ap^S Plasmids RP4-2.2

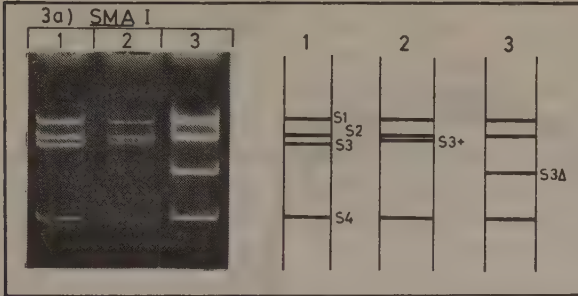


Abb. 3a: SmaI-Ver-
dauung von
(2) RP4-2.2 und
(3) RP4-2.1
im Vergleich zu
(1) RP4.
1% Agarose, 10V,
20 mA, 16 Std.

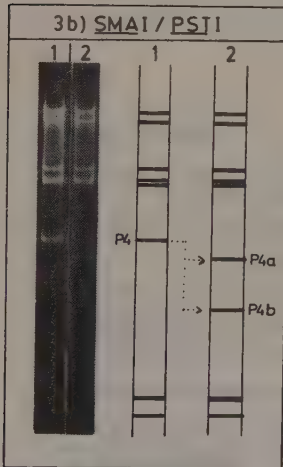


Abb. 3b: SmaI/PstI-
Doppelverdauung von
(1) RP4
(2) RP4-2.2
1% Agarose, 90 V,
140 mA, 2.5 Std.

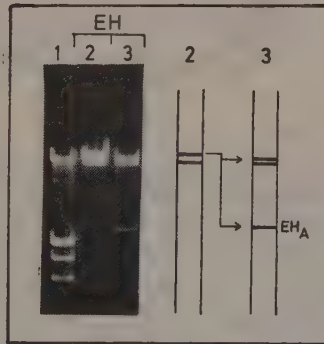


Abb. 3c: EcoRI/HindIII-Doppel-
verdauung von RP4-2.2 (3) im
Vergleich zu RP4 (2).
In Spur (1) ist als Längenmar-
kierung EcoRI/HindIII-verdaute
λ-DNA aufgetragen.
1% Agarose, 80 V, 120 mA, 2.5 Std.

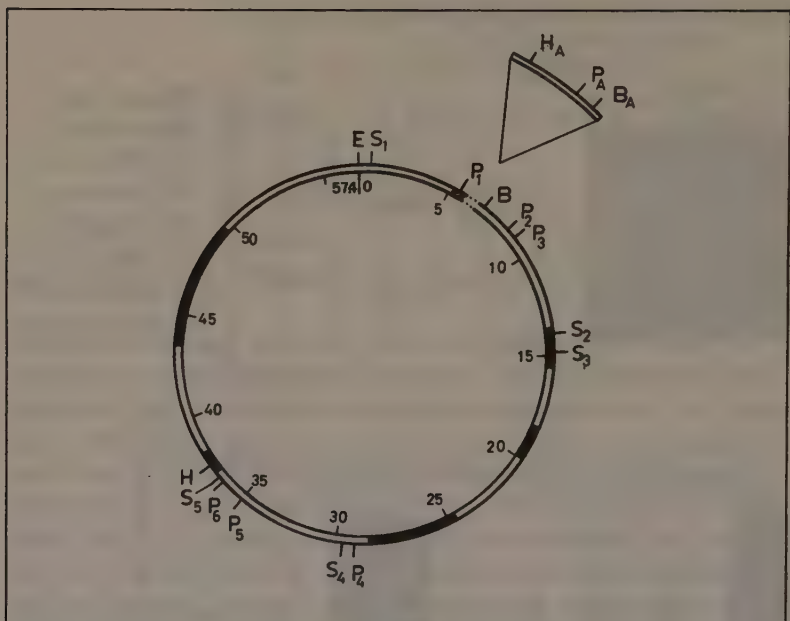


Abb. 4: Physikalische Karte der Ap^S Mutante RP4-2.2

Zwischen den Positionen P_1 und B des RP4-Moleküls (innerhalb Transposon Tn1) ist eine DNA-Sequenz von 1.1 - 1.2 kb Länge integriert, die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme HindIII (H_A), PstI (P_A) und vermutlich BamHI (B_A) trägt. Die Insertion ist verbunden mit einer Deletion von ca. 500 bp, auf die vermutlich der Ap^S Phänotyp dieser Mutante zurückzuführen ist.

neuer Pst-Schnitt (P_A) in Fragment S3+ erkennbar, der das Fragment P4 (2.6 kb) in die Bruchstücke P4a (2.3 kb) und P4b (0.95 kb) spaltet (Abb. 3b).

Daraus resultiert zusätzliche DNA von 0.65 kb, die zwischen die Positionen P_1 und B eingeschoben ist. Gleichzeitig wird in diesem Bereich eine neue Erkennungssequenz für das Enzym HindIII (H_A) eingeführt, dokumentiert durch die Bande EH_A in Abb. 3c.

Die Existenz einer BamHI-Stelle (B_A) auf dem integrierten DNA-Element zwischen den Positionen P_1 und B ist auf Grund von BamHI-Mehrfachverdauungen wahrscheinlich; sie läßt sich jedoch wegen der engen Nachbarschaft zu B im Agarosegel nicht eindeutig nachweisen.

Das Auftreten der neuen Restriktionsstellen ist mit einem Verlust von RP4-DNA (ca. 500 bp) verbunden, auf den vermutlich die Ap-Sensitivität zurückzuführen ist.

Wegen dieser Deletion ergibt sich für die Insertion statt der oben errechneten 0,65 kb eine Länge von ungefähr 1,1 - 1,2 kb.

Die Veränderungen, die im Ap-Transposon der Mutante RP4-2,2 auftreten, sind in Abb. 4 skizziert.

Wie in allen folgenden physikalischen Karten ist die Insertion in einem größeren Maßstab gezeichnet als das RP4-Molekül.

Plasmid RP4-2.3

Die in Abbildung 5 gezeigten Verdauungen mit den Enzymen EcoRI, HindIII und BamHI ermöglichen bereits Aussagen über strukturelle Veränderungen in diesem Plasmid, nämlich die Einführung von Erkennungsstellen für HindIII und BamHI. Das Auftreten des EcoRI/HindIII-Fragments 3 ist auf eine neue Spaltstelle H_A im Bereich des Ap-Transposons zurück-

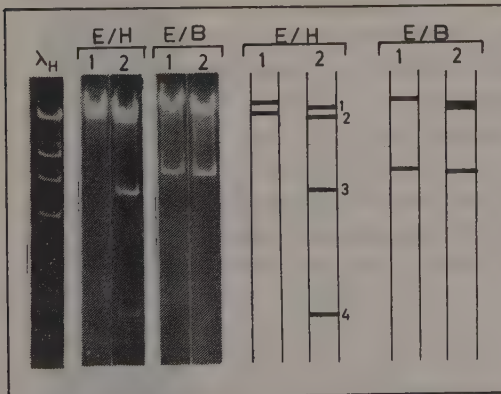


Abb.5: EcoRI/HindIII- und EcoRI/BamHI-Verdauung von

(1) RP4

(2) RP4-2,3

Zum Vergleich der Fragmentgrößen ist HindIII-verdaute λ -DNA aufgetragen.

0,7% Agarose, 75V, 150mA, 4,75 Std.

zuführen; das kleine Fragment 4 von ca. 1.5 kb verdeutlicht einen zusätzlichen HindIII-Schnitt (H_K) in Nähe des Originalschnittes H.

Wie das EcoRI/BamHI-Spaltmuster erkennen läßt, ist gegenüber von B eine zweite BamHI-Stelle (B_K) vorhanden, so daß zwei annähernd gleich große Fragmente entstehen.

Trotz des neuen Schnittes H_A in Tn1 zeigt die SmaI-Verdauung (Abb.6a) keine auffallenden Veränderungen des entsprechenden Fragments S3. Dagegen kommen die Schnittstellen H_K und B_K in der Vergrößerung der Bande S4 zum Ausdruck. Die PstI-Verdauung (Abb.6b) ermöglicht die genauere Lokalisierung des inserierten DNA-Stücks in Fragment P5.

Anstelle dieses Fragments treten zwei neue Banden P5a und P5b auf, hervorgerufen durch die neu eingeführte PstI-Stelle P_K . Aus den Längen der Spaltstücke P5a (1.35 kb) und P5b (0.4 kb) läßt sich für die DNA-Insertion eine Größe von ca. 1.1 kb errechnen.

Das PstI-Fragment P5a wird von dem HindIII-Schnitt H_K gespalten (Abb.6c), während die neu auftretende BamHI-Stelle auf dem Fragment P5b lokalisiert ist.

Daraus leitet sich für die in Fragment P5 eingeführten Restriktionsstellen die in Abbildung 7 dargestellte Reihenfolge ab.

Eine Insertion in Tn1 ist bereits durch das Auftreten des neuen HindIII-Schnittes H_A nachgewiesen. Durch PstI-Verdauung kann diese Insertion näher charakterisiert werden (Abb.6b,c). Anstelle des RP4-Fragments P4 tritt das Fragment P4a auf, das durch einen neuen PstI-Schnitt P_A entsteht. Das Fehlen der zu fordernden Bande P4b hat seine Ursache in einer Deletion von ca. 900 bp, durch die die Restriktionsstelle P_1 eliminiert wird. Wie in Plasmid RP4-2.2 ist auch hier die Einschlebung eines BamHI-Schnittes B_A wahrscheinlich (zwischen die Positionen P_A und B), kann aber nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Gesamtstruktur von RP4-2.3 ist in Abbildung 7 dargestellt.

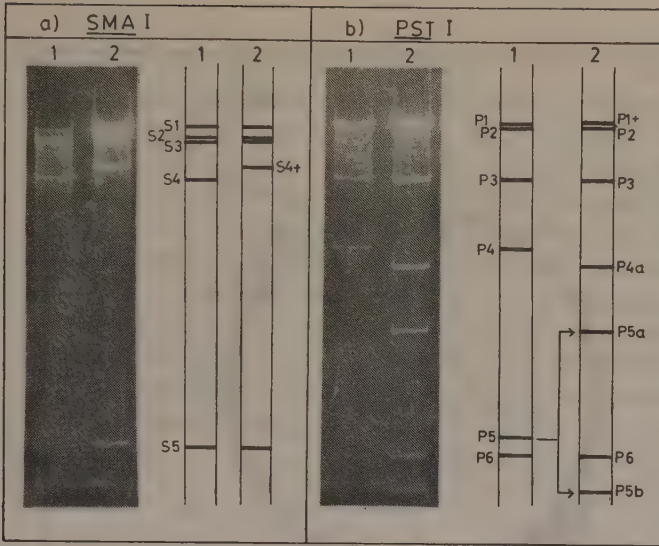


Abb. 6a, b: Restriktionsmuster der Plasmide RP4 (1) und RP4-2.3 (2) nach a) SmaI-Verdauung
b) PstI-Verdauung
1% Agarose, 100 V, 120 mA, 2.5 Std.

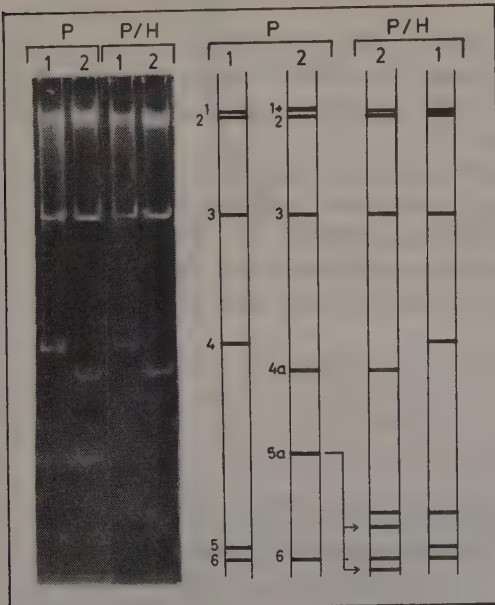


Abb. 6c: PstI- und PstI/HindIII-Spaltung der Plasmide
(1) RP4
(2) RP4-2.3
1% Agarose, 15 V, 15.5 Std.

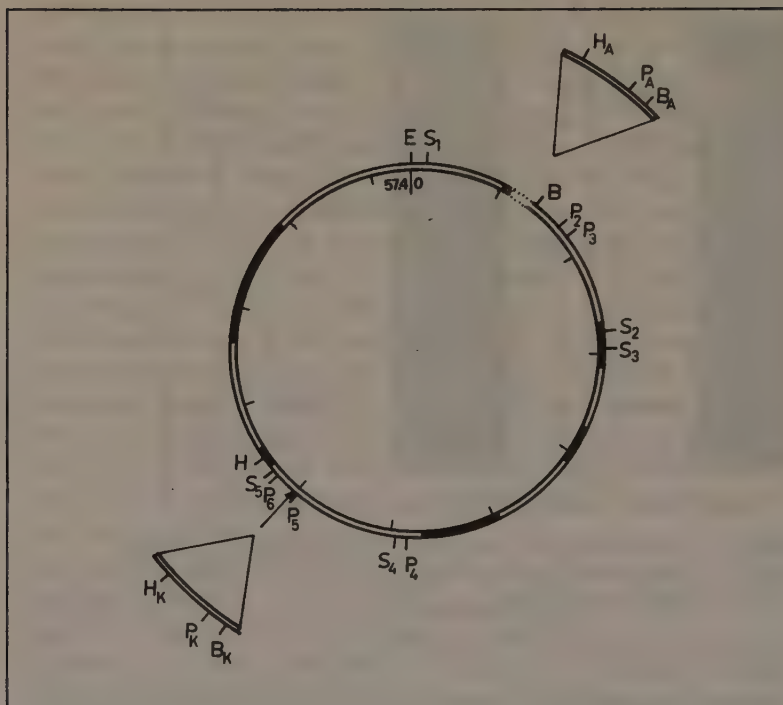


Abb.7: Molekülstruktur des Ap^S Plasmids RP4-2.3

Die Ap^S Mutante RP4-2.3 trägt zwei DNA-Insertionen, die beide neue Schnittstellen für HindIII, PstI und BamHI in das Molekül einführen.

Wie in RP4-2.2 ist eine dieser Insertionen in Tn1 lokalisiert. Sie ist verbunden mit einer Deletion von 900 bp, die einen Teil des Ap^R -Gens eliminiert.

Zusätzlich findet sich eine zweite Insertion in Nähe der Km^R Determinante, die sich phänotypisch aber nicht bemerkbar macht.

Plasmid RP4-2.1

Es soll hier noch kurz eine dritte Ap^S RP4-Mutante vorgestellt werden. Die Restriktionsanalyse dieses Plasmids, die hier nicht nachvollzogen werden soll, ergab die in Abb.8 dargestellt Molekülstruktur.

Wie die Mutante RP4-2.3 besitzt auch dieses Plasmid zwei in Bezug auf Länge und Restriktionsstellen identische DNA-Insertionen, die in entgegengesetzten Richtungen integriert sind. Ein Vergleich der beiden Molekülstrukturen (Abb.7, Abb.8) läßt jedoch zwei wesentliche Unterschiede erkennen. Zum einen ist die Insertion im Ap-Transposon von RP4-2.1 mit einer wesentlich größeren Deletion (4,5 kb) verbunden, durch die die Schnittstellen P_1 , B, P_2 und P_3 verloren gehen. Zum anderen ist die zweite Insertion zwar ungefähr in der gleichen RP4-Region wie in RP4-2.3 integriert, jedoch nicht zwischen den Schnittstellen P_E und P_5 , sondern zwischen den Positionen H und S_5 .

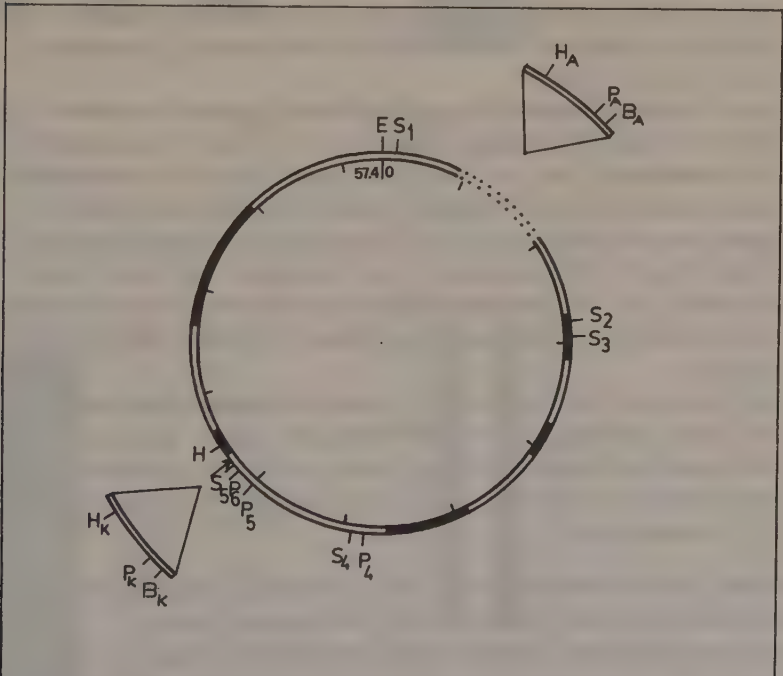


Abb.8: Karte des Plasmids RP4-2.1, das zwei Insertionen trägt, die sowohl untereinander als auch mit den bisher gefundenen Insertionen in Bezug auf Länge und Restriktionsstellen identisch sind. Während mit der Insertion in Tn1 eine Deletion verbunden ist, die das Ap-Gen eliminiert, nimmt die zweite Insertion keinen Einfluß auf die Km-Resistenz.

II.2.2 : Km^S Mutanten (RP4-3.1, RP4-3.2)

Obwohl die Mutanten RP4-3.1 und RP4-3.2 nach wie vor resistent gegen Ampicillin sind, zeigen beide Plasmide Veränderungen in Tn1, die sich als identisch erwiesen.

Dabei handelt es sich um eine Insertion, die aus der Verlängerung des SmaI-Fragments S3 (Abb.9) ersichtlich wird. Wie in den Ap^S Mutanten trägt das integrierte DNA-Element eine Erkennungsstelle für PstI (P_A), die das PstI-Fragment P4 in die Spaltstücke P4a (2.3 kb) und P4b (1.45 kb) teilt (Abb.10). Daraus errechnet sich für die eingefügte DNA-Sequenz eine Länge von 1.15 kb.

Bei Nachverdauung mit HindIII wird das Fragment P4b gespalten (Abb.10), woraus sich in Übereinstimmung mit EcoRI/HindIII-Spaltungen ein neuer HindIII-Schnitt H_A zwischen P₁ und P_A ableitet.

Da in den Km^S Mutanten in Nachbarschaft dieser Insertion keine Deletionen auftreten, läßt sich aus der Fragmentanalyse ermitteln, daß die Insertion innerhalb des Fragmentes P4 sehr nahe an der RP4-BamHI-Stelle B integriert ist. BamHI-Doppelverdauungen geben Hinweise auf einen zusätzlichen Schnitt B_A zwischen P_A und B. Wegen der engen Nachbarschaft der beiden BamHI-Erkennungsstellen ist eine direkte Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese jedoch nicht möglich.

Ein Vergleich mit den bisher vorgestellten Restriktionskarten zeigt, daß die in den Km^S Plasmiden in Tn1 integrierten DNA-Elemente bezüglich Länge, Schnittstellen, deren Abstände und Reihenfolge identisch sind mit den DNA-Insertionen der Ap^S RP4-Mutanten.

Neben diesen Insertionen in Tn1 zeigen beide Plasmide Veränderungen in Nachbarschaft der Km^R-Determinante.

In Verdauungen mit BamHI treten zwei große Fragmente auf, die auf die Insertion einer BamHI-Erkennungssequenz B_K etwa gegenüber von B zurückzuführen sind.

Bei Plasmid RP4-3.2 kommen Veränderungen in diesem Bereich des Moleküls ebenfalls durch die nach oben verschobene PstI-Bande P3 und durch das Fehlen des daran angrenzenden Frag-

Verdauung der Km^S Mutanten RP4-3.2 und RP4-3.1

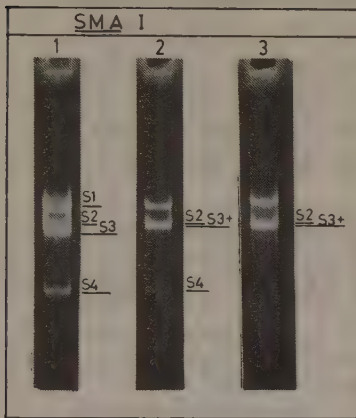


Abb.9: Verdauung mit SmaI:

- (1) RP4
 - (2) RP4-3.1
 - (3) RP4-3.2
- 1% Agarose, 90V, 2.5 Std.

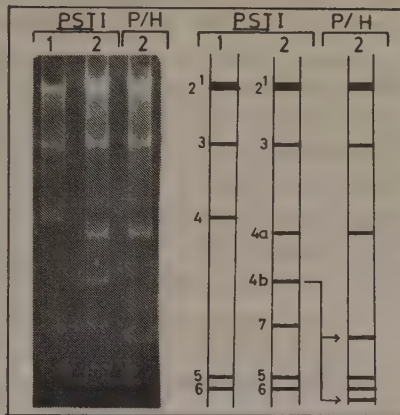


Abb.10: Spaltung mit PstI und

- PstI/HindIII: (1) RP4
 - (2) RP4-3.1
- 1% Agarose, 120V, 120 mA 2 Std.

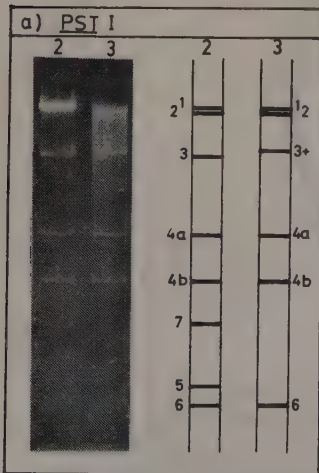


Abb.11a: PstI-Verdauung

- (2) RP4-3.1
 - (3) RP4-3.2
- 1% Agarose, 75V, 2.5Std.

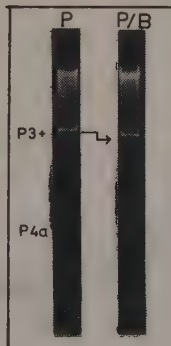


Abb.11b: PstI- und PstI/BamHI-

- Verdauung des Plasmids
 - RP4-3.2.
- 1% Agarose, 80V, 120mA,
2.5 Std.

ments P5 zum Ausdruck (Abb.11a, Spalte 3). Aus einer minimalen Verkürzung der Bande P3+ bei Nachverdauung mit BamHI geht hervor, daß dieses Fragment eine sehr asymmetrisch gelegene Schnittstelle für BamHI (B_K) besitzt (Abb.11b). Im Zusammenhang mit der in der SmaI-Verdauung (Abb.9) fehlenden Bande S4 ergibt sich neben der Insertion der eng benachbarten Restriktionsstellen P_K und B_K die Deletion der Schnittstellen P_5 , P_6 und S_5 .

Eine HindIII-Stelle ist auf dieser Insertion nicht eindeutig nachzuweisen. Durch Agarosegelelektrophorese kann zwischen folgenden Möglichkeiten nicht unterschieden werden:

- eine HindIII-Stelle H vorhanden
- eine HindIII-Stelle H_K vorhanden, Deletion von H
- zwei eng benachbarte HindIII-Stellen H und H_K

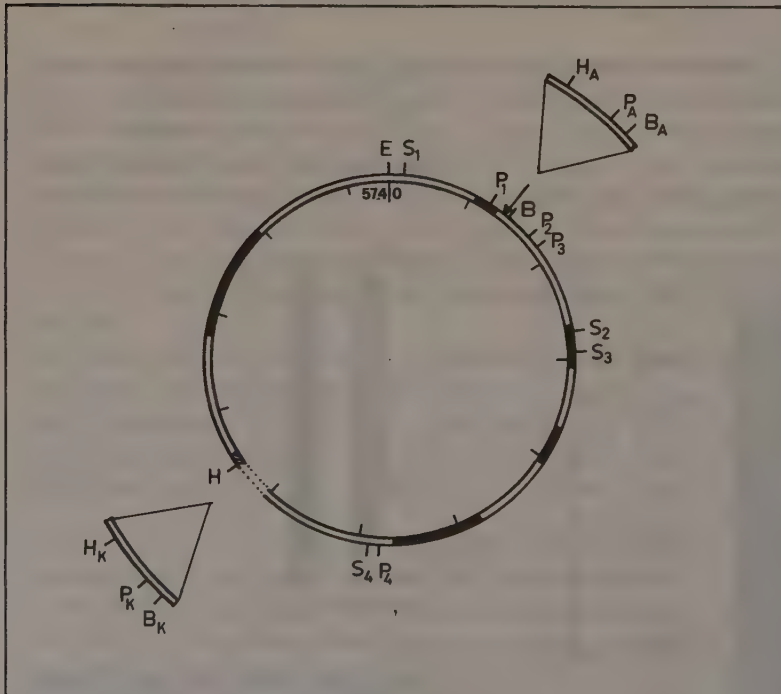
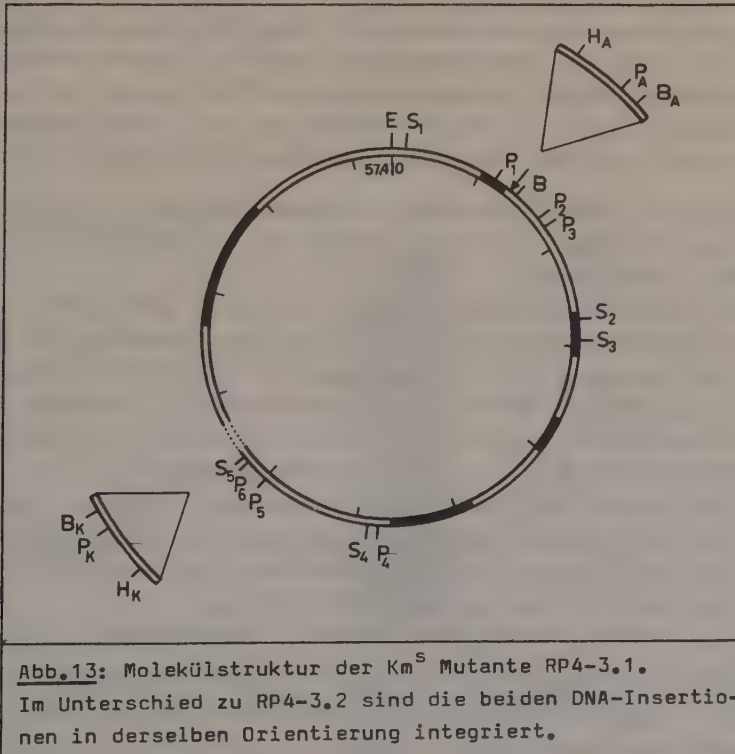


Abb.12: Physikalische Struktur der Km^S Mutante RP4-3.2. Das Plasmid trägt zwei identische DNA-Insertionen, die gegenläufig angeordnet sind. Die Km -Sensitivität wird durch eine Deletion verursacht.

In der in Abb.12 dargestellten Karte des RP4-3.2-Plasmids ist die Möglichkeit zweier eng benachbarter HindIII-Stellen angenommen.

Auch bei Plasmid RP4-3.1 wird gleichzeitig mit der Stelle B_K ein neuer Schnitt für PstI (P_K) in das Molekül eingeführt, der etwa 1.1 kb von P_6 im Uhrzeigersinn entfernt liegt (Abb.10, Spur 2). Das dadurch entstehende Fragment P7 wird von HindIII, nicht aber von BamHI geschnitten. Aus SmaI/HindIII- und SmaI/BamHI-Mehrfachverdauungen resultiert das Auftreten eines neuen Schnittes H_K zwischen den Positionen P_6 und P_K , während die ursprüngliche Stelle H deletiert ist. Insgesamt ergibt sich für das Plasmid RP4-3.1 die in Abb.13 dargestellte Struktur.



II.2.3 : Ap^S, Km^S RP4-Mutanten

Als Beispiel für diese Mutantengruppe soll in diesem Abschnitt das Plasmid RP4-5.81 ausführlich beschrieben werden.

Aus Abb.14a wird deutlich, daß in dieser Mutante wieder zwei Insertionen auftreten. Aus den zwei großen Fragmenten der EcoRI/BamHI-Verdauung leitet sich ein neuer BamHI-Schnitt B_K in Nähe der Km^r-Genregion ab. Die bei EcoRI/HindIII-Verdauung sichtbare neue Bande wird hervorgerufen durch die Einführung eines HindIII-Schnittes H_A in das Ap-Transposon Tn1.

Die Aufspaltung des PstI-Fragmentes P4 in die Spaltstücke P4a und P4b (Abb.15a) zeigt, daß in Tn1 Veränderungen auftreten, die eine bereits bekannte Struktur aufweisen: die Einführung einer DNA-Sequenz mit Schnittstellen für HindIII (H_A), PstI (P_A) und vermutlich BamHI (B_A) zwischen die Positionen P₁ und B. Die Integration des DNA-Elements ist in dieser Mutante mit einer Deletion von ca. 0.3 kb verbunden, die sich aus der Länge des Fragments P4b errechnen läßt.

Nun zur zweiten Insertion in Plasmid RP4-5.81, die an Hand der neuen BamHI-Stelle B_K in Nähe der Km^r-Determinante lokalisiert wurde.

In der SmaI-Verdauung ist neben dem Fehlen der Bande S4 die Vergrößerung des Fragments S1 auffallend (Abb.14b). In Übereinstimmung zu der fehlenden Bande S4 steht die Verlängerung des PstI-Fragments P3 und das Fehlen des sich daran anschließenden Fragments P5 (Abb.15a). Es zeigt sich, daß die Schnittstellen P₅, P₆ und S₅ deletiert sind.

Das Fragment P3+ ist auf einen neuen PstI-Schnitt P_K zurückzuführen; aus der PstI/BamHI-Verdauung der Abb.15b geht hervor, daß die neue Restriktionsstelle B_K in Fragment P3+ lokalisiert ist und zwar sehr dicht an P_K.

Die Position der in dieser Region liegenden HindIII-Stelle ist wie bei Plasmid RP4-3.2 nicht eindeutig festzulegen.

Die Gesamtstruktur des Plasmides RP4-5.81 ist in Abb.16 dargestellt.

Verdauung von RP4-5.81 (Ap^S, Km^S)

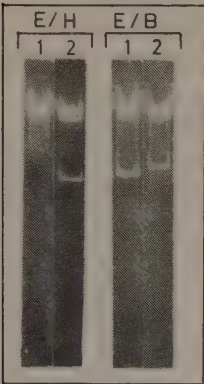


Abb.14a: Doppelverdauung mit EcoRI/HindIII und EcoRI/BamHI
(1) RP4
(2) RP4-5.81
0.9% Agarose, 80V, 2.5 Std.

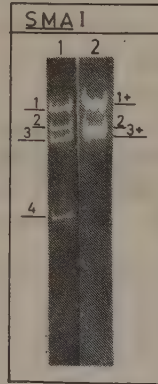


Abb.14b: SmaI-Spaltung von
(1) RP4
(2) RP4-5.81
0.7% Agarose, 90V, 3 Std.

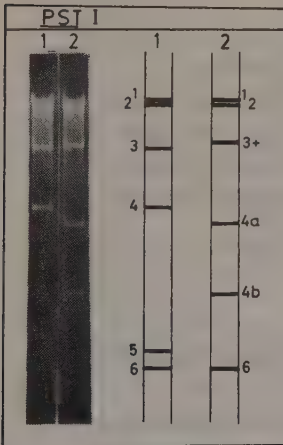


Abb.15a: PstI-Verdauung von
(1) RP4
(2) RP4-5.81
1% Agarose, 80V, 2.5 Std.

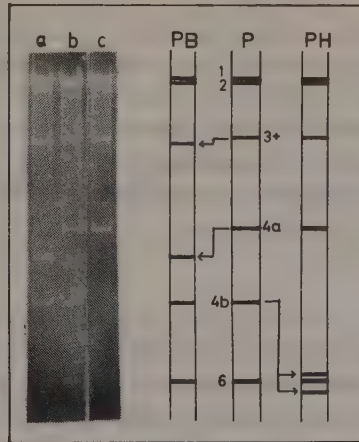


Abb.15b: Nachverdauung der PstI-
gespaltenen DNA mit HindIII und
BamHI; a) PstI/BamHI
b) PstI
c) PstI/HindIII
1% Agarose, 100V, 2 Std.

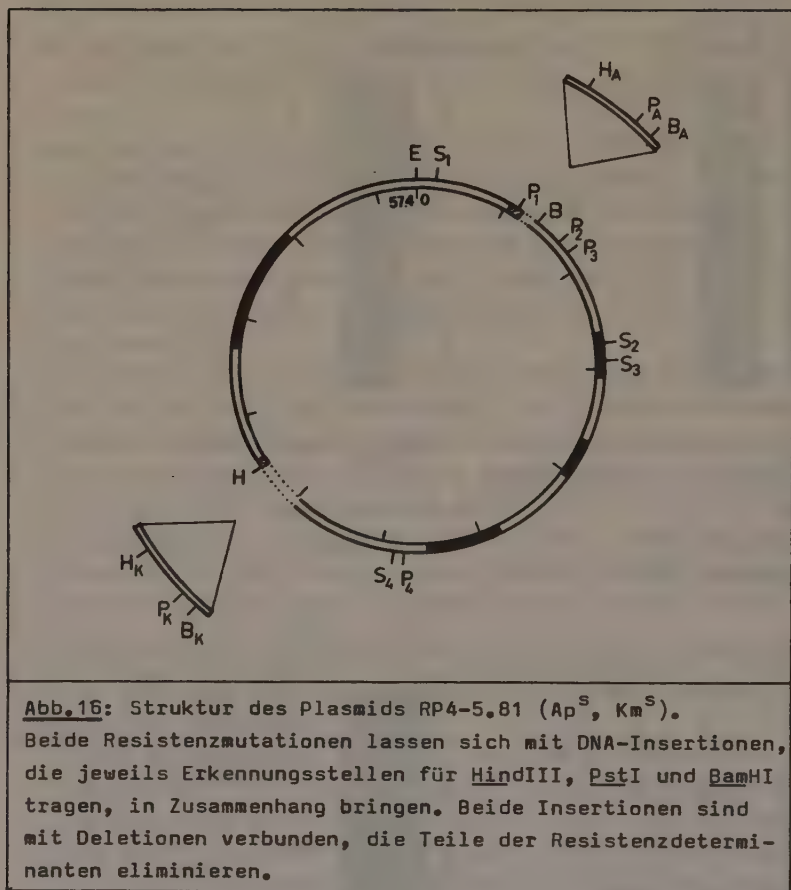


Abb.16: Struktur des Plasmids RP4-5.81 (Ap^S, Km^S). Beide Resistenzmutationen lassen sich mit DNA-Insertionen, die jeweils Erkennungsstellen für HindIII, PstI und BamHI tragen, in Zusammenhang bringen. Beide Insertionen sind mit Deletionen verbunden, die Teile der Resistenzdeterminanten eliminieren.

Abb.17 zeigt die Struktur einer anderen Ap^S, Km^S RP4-Mutante, des Plasmids RP4-5.1.

Diese Mutante soll demonstrieren, daß Km-Sensitivität nicht immer durch eine Deletion verursacht wird, wie es in den bisher vorgestellten Km^S Plasmiden (RP4-3.1, RP4-3.2, RP4-5.81) der Fall ist.

In RP4-5.1 ist ein 1.15 kb langes DNA-Element (mit Schnittstellen für die Enzyme HindIII, PstI und BamHI) dicht neben

der HindIII-Stelle des RP4-Plasmids integriert; eine Deletion im Zusammenhang mit dieser Insertion konnte nicht nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich, daß der Verlust der Km^r direkt durch die Insertion selbst hervorgerufen wird. Im Falle des Ap^r -Verlusts ist die Situation analog der bisher beschriebenen Ap^s Mutanten: die Integration eines DNA-Elements mit Schnittstellen für HindIII, PstI und BamHI ist verbunden mit einer Deletion, die in dieser Mutante etwa das gesamte Tn1-Transposon umfaßt.

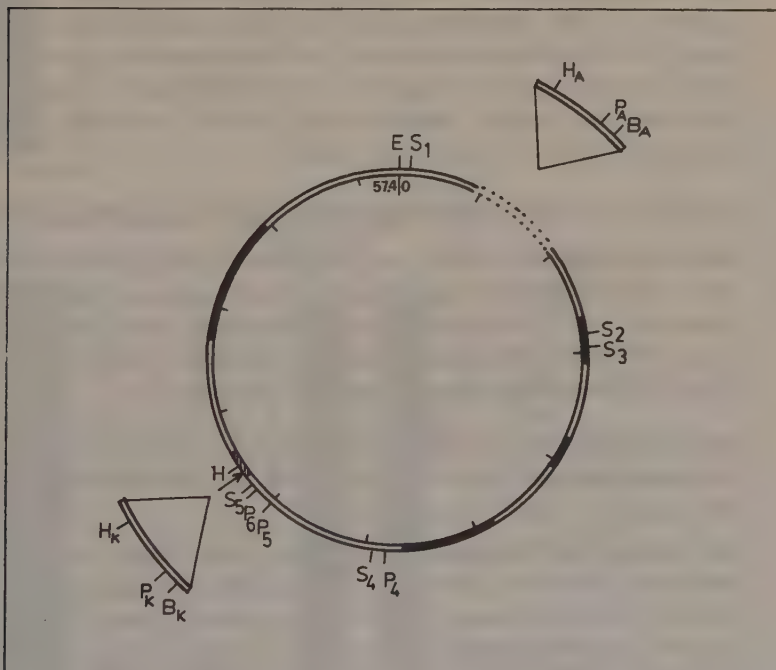


Abb.17: Physikalische Karte des Ap^s , Km^s Plasmids RP4-5.1. Die Km -Sensitivität ist auf die Insertion innerhalb der Resistenzdeterminante zurückzuführen, während die Ap -Resistenz durch eine mit einer zweiten Insertion korrelierten Deletion (4.5 kb) verloren geht.

II.2.4 : RP4-Transfermutanten

Die bisherige Untersuchung von RP4-Resistenzmutanten ergab die Insertion eines DNA-Elementes jeweils in Nähe der Resistenzdeterminanten.

Von Interesse war nun, ob andere phänotypische Veränderungen ebenfalls mit der Insertion einer vergleichbaren Sequenz in Zusammenhang zu bringen sind.

Als Untersuchungsobjekt bieten sich dabei die transferdefekten RP4-Plasmide an, deren Isolierung und genetische Untersuchung in den Abschnitten D.I.1.2 und D.I.2.2 beschrieben sind. In diesen Kapiteln wurde zwischen transfernegativen (Tra^-) und transferverminderten (Tra^V) Mutanten unterschieden. Sie sollen deswegen auch in den folgenden Untersuchungen getrennt behandelt werden.

II.2.4.1: Transferverminderte RP4-Plasmide: Beispiel RP4-12

Das Plasmid RP4-12 trägt noch alle drei Resistenzmarkierungen, fällt aber durch veränderte Transfereigenschaften auf. Innerhalb von *Rhizobium lupini*-Stämmen ist kein Transfer zu beobachten; RP4-12 kann aber mit geringer Häufigkeit auf *E.coli* C übertragen werden (vergl. D.I.2.2.2).

Zur Untersuchung des molekularen Hintergrunds dieses Transferverhaltens wurde die Mutante nach Konjugationstransfer mit *R.lupini* aus *E.coli* isoliert.

Die EcoRI/HindIII-Verdauung der RP4-12-DNA (Abb.18a) dokumentiert durch das Auftreten eines neuen Fragmentes die Einführung eines neuen HindIII-Schnittes H_A in das Transposon Tn1. Gleichzeitig mit H_A tritt innerhalb des Fragmentes P4 ein neuer PstI-Schnitt P_A auf, der dieses Fragment P4 in die Spaltstücke P4a und P4b zerlegt (Abb.18b). In Übereinstimmung damit ist das SmaI-Fragment S3 um ca. 1100 bp verlängert (Abb.18c).

Die Karte des Tra^V -Plasmids ist in Abb.19 dargestellt.

Weitere Veränderungen in der Molekülstruktur des Plasmids RP4-12 konnten durch Restriktionsanalyse nicht entdeckt werden (ebenso wenig für die Tra^V Mutante RP4-13, dessen Restriktionsuntersuchung in einem späteren Kapitel beschrieben wird).

Abb.18: Restriktionsanalyse des Tra^V Plasmides RP4-12



Abb.18a: EcoRI/HindIII-Verdauung
der Mutante RP4-12 (2) im Vergleich
zu RP4 (1);
0.9% Agarose, 80V, 120mA, 2.5 Std.

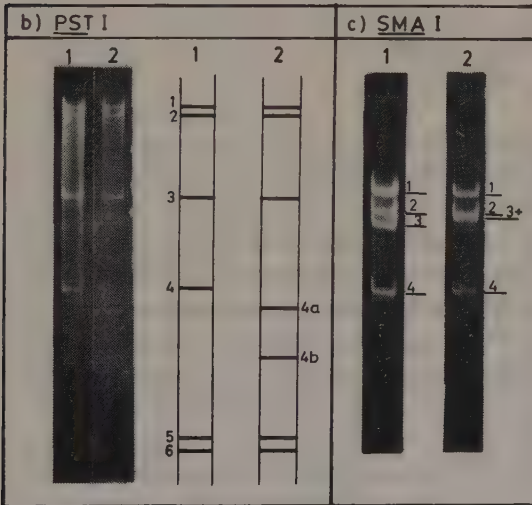


Abb.18c: Fragment-
muster von
(1) RP4
(2) RP4-12
nach Spaltung mit
SmaI.
0.7% Agarose, 80V
120mA, 2.5 Std.

Abb.18b: PstI-Verdauung von

- (1) RP4
- (2) RP4-12

0.7% Agarose, 60V, 3 Std.

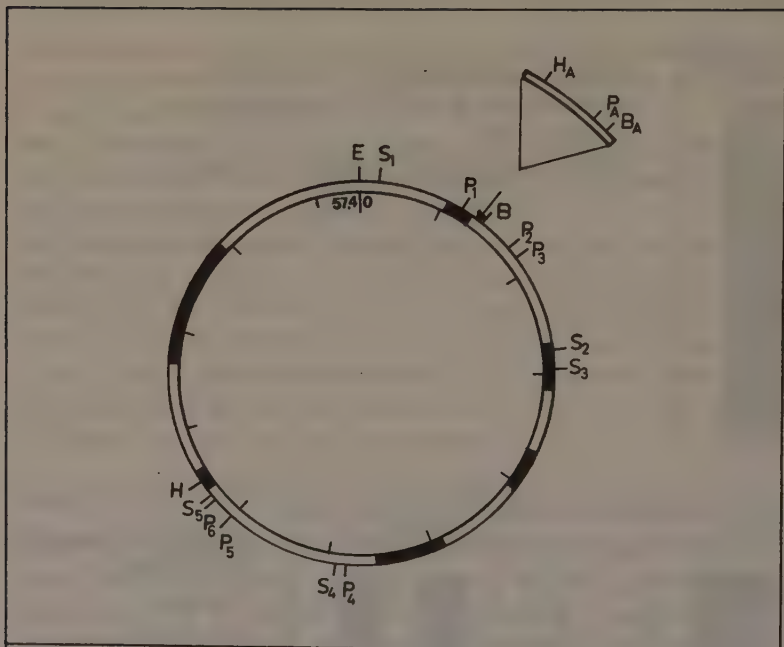


Abb.19: Veränderungen in der Molekülstruktur des transferverminderten Plasmids RP4-12.

Das DNA-Element in Tn1 entspricht in seiner Größe (1.15kb) und in Bezug auf Art und Anordnung der Restriktionsstellen den für die Resistenzmutanten beschriebenen Insertionen und ist wie in den RP4-3 - Mutanten dicht neben dem BamHI-Schnitt B integriert.

Dieses Ergebnis stimmt mit den genetischen Untersuchungen des Abschnittes D.I.2.2 überein, die für beide Plasmide RP4-12 und RP4-13 eine normale Transferrate innerhalb E.coli ergaben.

Eine mögliche Erklärung wird in Teil E.IV.3 dieser Arbeit diskutiert.

II.2.4.2: Transfernegative RP4-Mutanten (RP4-13.1, RP4-5.82)

Die Isolierung der vollkommen transfernegativen RP4-Plasmide RP4-13.1 und RP4-5.82 gelang durch Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA aus den *R.lupini*-Stämmen M137-13 und M137-7 (vergl. D.I.3).

Das Plasmid RP4-13.1 besitzt noch alle RP4-spezifischen Resistenzmarker und zeichnet sich nur durch den totalen Verlust der Transferierbarkeit aus.

Transformation der Plasmid-DNA aus M137-7 führte einerseits zur Identifizierung des Tc^R , Tra^+ Plasmides RP4-5.81 (vergl. D.II.2.3), andererseits zur Isolierung einer transfernegativen Mutante, die mit RP4-5.82 bezeichnet wurde.

Eine grundlegende Änderung im Restriktionsverhalten der transfernegativen RP4-Mutanten wird im PstI-Spaltmuster deutlich (Abb.20a): an Stelle der Bande P2 treten zwei neue Fragmente auf, P2a und P2b, die bei Plasmid RP4-13.1 (Spur 2) eine ungefähre Länge von 11.5 kb bzw. 10 kb haben. In Plasmid RP4-5.82 (Spur 3) ist die Bande P2b um circa 1000 bp nach unten verschoben.

Die Ursache, die zur Entstehung dieser P2-Spaltprodukte führt, liegt in einem neuen PstI-Schnitt (P_T) etwa in der Mitte des Fragments P2, das bei Position P_3 innerhalb $Tn1$ beginnt und sich über die Tc^R -Region und die beiden Transferregionen $Tra2$ und $Tra3$ bis zur Schnittstelle P_4 erstreckt. Abb.20d zeigt, daß in RP4-13.1 das größere der beiden PstI-Fragmente P2a bei Nachverdauung mit HindIII (Spalte c) etwas verkürzt wird, während BamHI (Spur a) in Fragment P2b eine Erkennungsstelle besitzt.

Damit liegt in diesem Bereich wieder die Insertion eines DNA-Elementes mit Schnittstellen für die Enzyme HindIII (H_T), PstI (P_T) und BamHI (B_T) vor.

Analog sind die Ergebnisse für die Mutante RP4-5.82.

Da das Fragment P2 des RP4-Moleküls nur zwei eng benachbarte Schnittstellen für SmaI trägt, läßt sich eine genauere Lokalisierung der Insertion durch Verdauungen mit diesem Enzym erreichen. Es ergibt sich, daß das SmaI-Fragment S2, das deutlich vergrößert ist (vergl. Abb.20b), jeweils einmal von den Enzymen PstI, HindIII und BamHI geschnitten wird. Aus den

Abb.20a: Spaltung der transfernegativen Plasmide RP4-13.1 und RP4-5.82

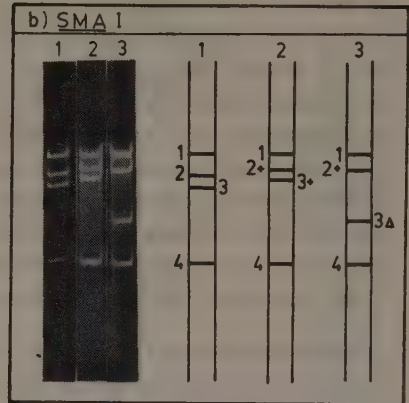
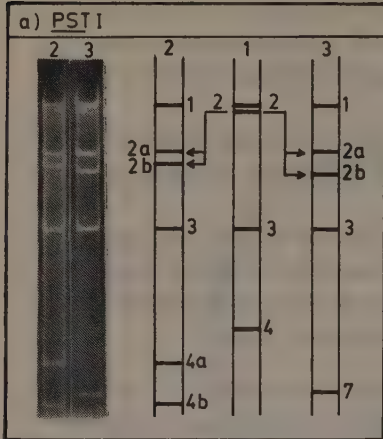


Abb.20a: PstI-Verdauung

Abb.20b: SmaI-Verdauung

Für beide Abbildungen gilt: (1) RP4; (2) RP4-13.1; (3) RP4-5.82
0.7% Agarose, 80V, 120mA, 2.5 Std.

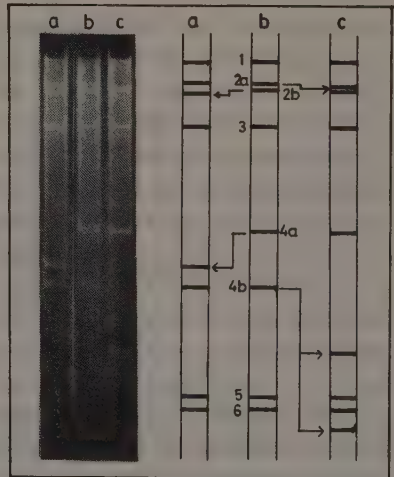
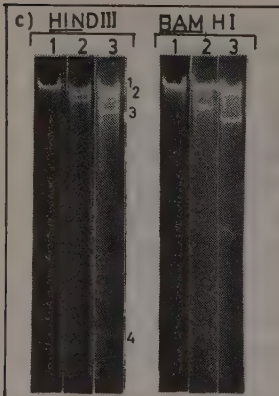


Abb.20c: Fragmente der HindIII- und BamHI-Verdauung; (1) RP4

(2) RP4-13.1

(3) RP4-5.82

1% Agarose, 90V, 140mA
2 Std.

Abb.20d: Verdauung von RP4-13.1

mit a) PstI/BamHI

b) PstI

c) PstI/HindIII

1% Agarose, 100V, 140mA, 2.5 Std.

Größen der entstehenden Fragmente läßt sich errechnen, daß die Insertion in der Transferregion Tra3 lokalisiert ist und etwa eine Länge von 1.15 kb besitzt.

Neben dieser Insertion in Tra3 ist in beiden Molekülen noch an anderen Stellen die Integration von zusätzlicher DNA nachzuweisen.

Das wird durch die in Abb.20c dargestellten HindIII- und BamHI-Verdauungen demonstriert.

Plasmid RP4-13.1 (Spalte 2) zeigt 3 Banden im HindIII-Spaltmuster und zwei Fragmente bei Verdauung mit BamHI. Das bedeutet, daß in diesem Molekül zusätzlich zum Originalschnitt H und zur H_T-Stelle in Tra3 eine dritte HindIII-Erkennungssequenz eingeführt ist. Durch entsprechende Doppelverdauungen läßt sich dieser dritte Schnitt in Tn1 lokalisieren.

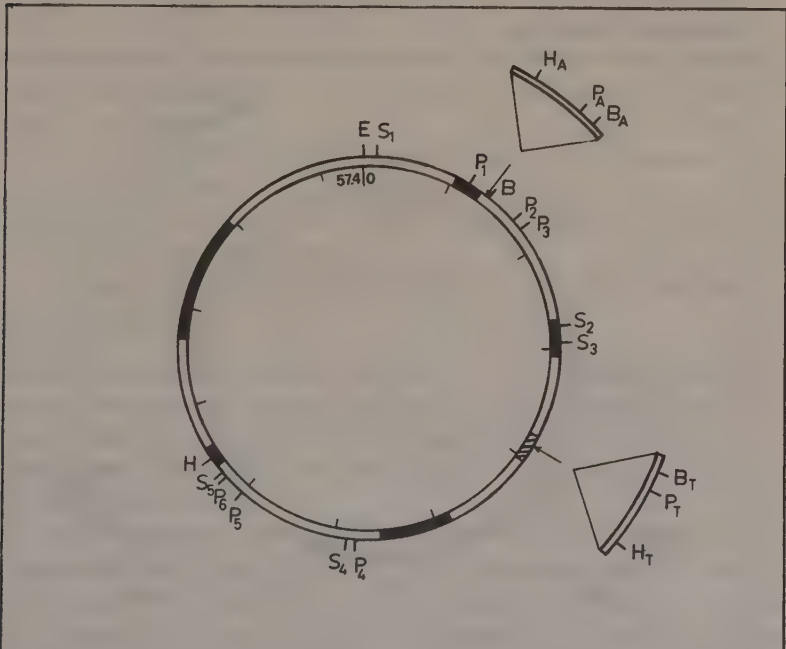


Abb.21: Insertionen in der transfernegativen Mutante RP4-13.1.

Die Transfernegativität wird durch eine Insertion in der Region Tra3 verursacht, die identisch aber gegenläufig zu der in Tn1 ist.

Die PstI-Verdauung in Abb.20a zeigt, daß mit H_A auch eine Erkennungsstelle für PstI, P_A , in Tn1 integriert ist (Spaltung des Fragments P4 in P_{4a} und P_{4b}).

Insgesamt ergibt sich für die Mutante RP4-13.1 die in Abb.21 gezeigte Struktur.

Plasmid RP4-5.82 läßt in Abb.20c (Spur 3) vier Schnittstellen für HindIII und drei für BamHI erkennen. Daraus resultieren insgesamt 3 Insertionen in diesem Molekül.

Einer dieser zusätzlichen HindIII-Schnitte ist zusammen mit einem PstI- und einem BamHI-Schnitt in Tn1 vorhanden (H_A , P_A , B_A). Diese Insertion ist mit einer Deletion von 4.65 kb verbunden, wie die Verkürzung des SmaI-Fragments S3 (Abb.20b, Spur 3) dokumentiert. In Zusammenhang mit dieser Deletion steht das Fehlen der PstI-Fragmente P4 und P6 (Abb.20a, Spur 3).

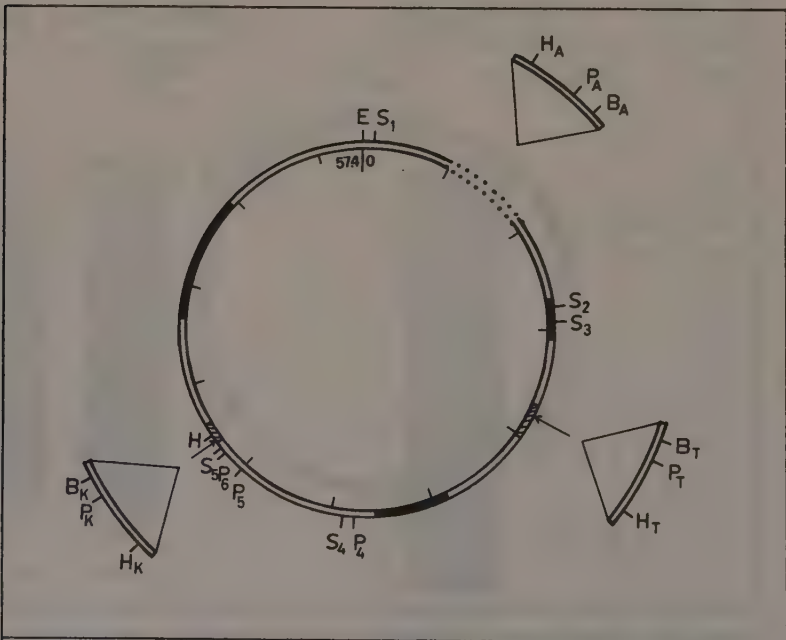


Abb.22: Karte des Plasmids RP4-5.82 (Ap^S , Km^S , Tra^-). Die drei Mutationen sind auf eine dreifache Integration ein- und desselben DNA-Elementes zurückzuführen; die Insertion in Tn1 ist mit einer Deletion von 4.65 kb verbunden.

Die in der PstI-Spaltung neu auftretende Bande P7 wird durch einen in der Km^r -Determinante gelegenen PstI-Schnitt P_K hervorgerufen. Diese neue PstI-Stelle tritt ebenfalls in Verbindung mit einem HindIII- und einem BamHI-Schnitt auf. Die Insertion ist 1,15 kb lang und inaktiviert die Genregion für Km^r .

Die Gesamtstruktur des Plasmids RP4-5.82 ist der Abb.22 zu entnehmen.

II.2.5 : Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Restriktionsanalyse verschiedener RP4-Mutanten, die unabhängig voneinander aus *R.lupini*-Stämmen isoliert wurden, ergaben, daß alle untersuchten Moleküle durch eine oder mehrere Insertionen gekennzeichnet sind.

Die integrierten DNA-Elemente zeigen grundsätzliche Übereinstimmungen, unabhängig davon, ob man die Insertionen in ein- und demselben oder in verschiedenen Plasmiden miteinander vergleicht:

- die inserierten DNA-Stücke sind von gleicher Länge (1150 bp);
- die Insertionen tragen Schnittstellen für die Enzyme HindIII, PstI und BamHI;
- Reihenfolge der Restriktionsstellen und ihre Abstände sind identisch.

Diese Resultate sprechen für die Existenz einer definierten Insertionssequenz, wie sie in Abb.23 wiedergegeben ist. Da dieses DNA-Element für alle RP4-Mutanten aus *R.lupini* typisch ist, nannten wir es ISR1 (Insertions-Sequenz aus Rhizobium lupini 1).

Die Bezeichnungen "Insertionselement" oder "Insertionssequenz", die im weiteren für ISR1 verwendet werden, sind nicht gleichbedeutend mit dem Ausdruck "IS-Element". Zu den IS-Elementen werden nur ganz bestimmte DNA-Sequenzen mit genau definierten Eigenschaften gezählt. Ob ISR1 in die Gruppe der IS-Elemente eingeordnet werden kann, wird in Abschnitt E.III diskutiert.

RP4-Plasmide, in denen die Integration von einem oder mehreren ISR1-Elementen nachgewiesen ist, werden mit RP4::ISR1

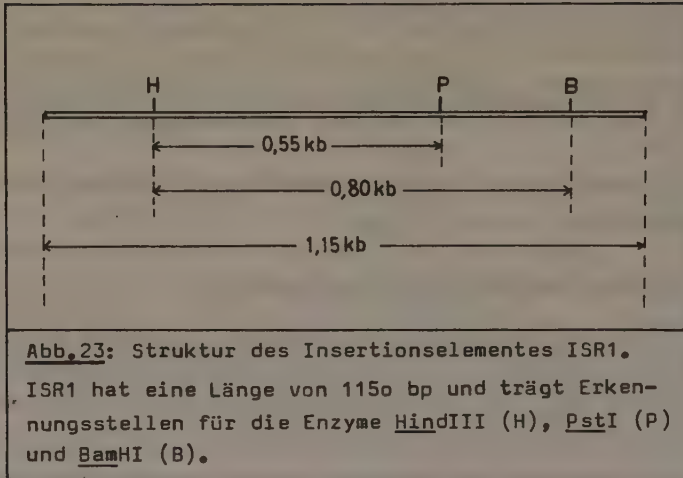


Abb. 23: Struktur des Insertionselementes ISR1.

ISR1 hat eine Länge von 1150 bp und trägt Erkennungsstellen für die Enzyme HindIII (H), PstI (P) und BamHI (B).

gekennzeichnet, analog der Bezeichnung, die für die Integration des Phagen Mu in ein Gen oder Genom verwendet wird (Howe und Bade, 1975).

Die Existenz der HindIII-Schnittstelle konnte bei Insertionen in Nähe der Km^r -Determinante nicht für alle untersuchten Mutanten eindeutig nachgewiesen werden.

In den Fällen, in denen die Insertion nahe an der Originalstelle H des RP4-Plasmids integriert ist, ist zwischen folgenden Möglichkeiten durch Agarosegelelektrophorese keine Unterscheidung möglich:

- a) zwei HindIII-Stellen (von RP4 und ISR1) liegen sehr dicht nebeneinander und werden im Gel nicht aufgetrennt;
- b) nur die RP4-eigene HindIII-Stelle ist vorhanden, die Insertion trägt keine HindIII-Stelle;
- c) nur eine HindIII-Stelle auf dem inserierten DNA-Element, die Restriktionsstelle H auf dem RP4-Plasmid ist deletiert.

Die Untersuchungen in ihrer Gesamtheit machen jedoch sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den Insertionen immer um das gleiche DNA-Element ISR1 handelt. Man kann also davon ausgehen, daß auch in den oben genannten Fällen eine Integration von ISR1 vorliegt, so daß die Möglichkeit b) ausgeschlossen werden soll.

Eine ähnliche Situation ergibt sich für die ISR1-spezifische Erkennungsstelle für BamHI bei den Insertionen in Tn1. Da der Abstand zwischen der ISR1-eigenen PstI-Stelle P_A und der BamHI-Stelle des RP4-Plasmids sehr gering ist, kann eine dazwischen liegende BamHI-Restriktionsstelle B_A durch BamHI- und PstI/BamHI-Verdauungen nicht sichtbar gemacht werden. Dazu sind die bei der Spaltung entstehenden Bruchstücke zu klein.

Die Existenz dieses Schnittes B_A zwischen den Positionen P_A und B ergibt sich aber aus den Längen der bei EcoRI/BamHI- und SmaI/BamHI-Verdauungen auftretenden Fragmente. Die Abstände zum EcoRI-Schnitt bzw. zur SmaI-Stelle S₁ sind in der Regel kürzer als die für den Original-BamHI-Schnitt B errechneten.

Die Integration von ISR1 wurde in beiden möglichen Orientierungen beobachtet. Die Richtung des ISR1-Elementes ergibt sich aus der Reihenfolge der durch die Insertion neu eingeführten Schnittstellen.

Insertionen des Elementes ISR1 konnten bisher in drei Regionen des RP4-Moleküls nachgewiesen werden (vergl. Abb.24):

- innerhalb des Ampicillin-Transposons Tn1
- in oder in Nähe der Km^r-Determinante
- innerhalb der Transferregion Tra3.

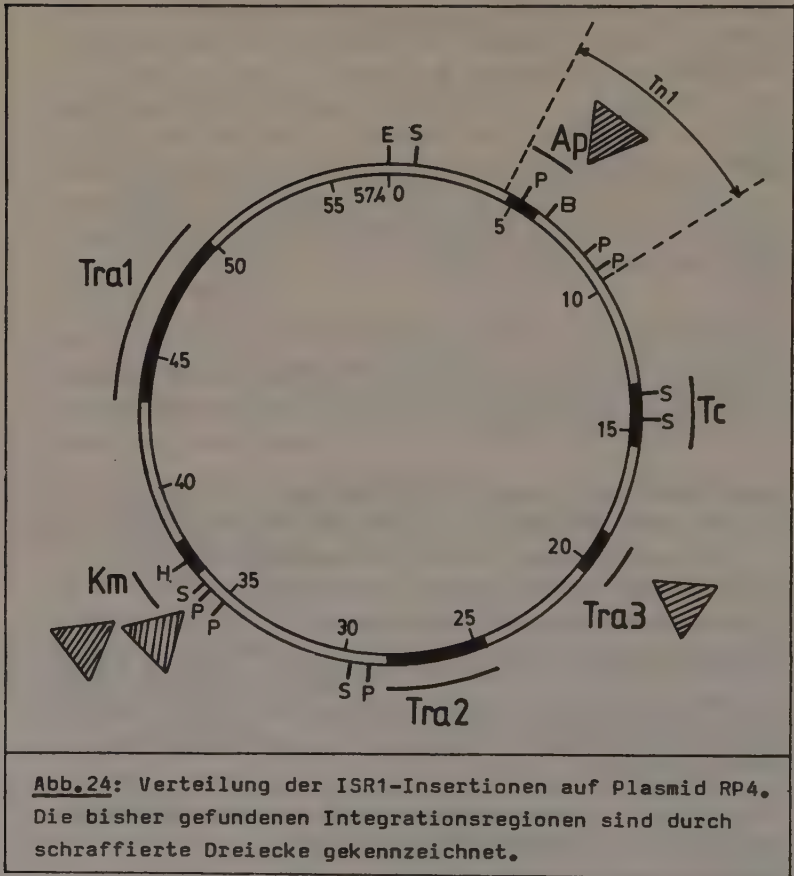
Entsprechend wird in der weiteren Arbeit zwischen ISR1_A (Insertion in Ap-Transposon), ISR1_K (in oder in Nachbarschaft der Km^r-Genregion) und ISR1_T (innerhalb Tra3) unterschieden.

Die ISR1_T-Insertionen sind immer an der gleichen Stelle innerhalb der Tra3-Region lokalisiert.

Eine definierte Integrationsstelle ist auch für die Insertion von ISR1 in Tn1 wahrscheinlich. Zumindest in den Mutanten, in denen keine Deletionen in Tn1 auftreten, ist ISR1_A nachweislich immer an derselben Stelle (links von B) inseriert.

Sowohl ISR1_A- als auch ISR1_T-Insertionen wurden bisher jeweils nur in einer bestimmten, einander gegenläufigen Orientierung gefunden.

Für die $ISR1_K$ -Insertionen scheint keine definierte Integrationsstelle und keine bestimmte Orientierung zu existieren, da diese Insertionen an verschiedenen Stellen und in beiden Richtungen beobachtet wurden.



II.3 : ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER ISR1- INSERTIONEN

Die oben zusammengefaßten Beobachtungen über Integrationsstellen und Orientierung von ISR1-Insertionen können durch elektronenmikroskopische Techniken, z.B. Homoduplex-Experimente, sichtbar gemacht werden.

Als anschauliches Beispiel eignet sich besonders das in II.2.4.2 vorgestellte Plasmid RP4-5.82, das sich durch Verlust der Ap^r , der Km^r und der Transferierbarkeit auszeichnet.

Die Restriktionsanalyse ergab für diese Mutante eine dreifache Insertion von ISR1: in Tn1, in Tra3 und in der Km^r -Genregion (vergl. die physikalische Karte in Abb.22). Unter Berücksichtigung der mit $ISR1_A$ verbundenen Deletion von 4.65 kb ergibt sich damit eine Gesamtlänge von 56.2 kb ($= 18.7 \mu m$).

In Abb.25 ist die Struktur des Plasmids RP4-5.82, wie sie sich aus der Fragmentanalyse ergibt, schematisch widergegeben. Da Einzelstränge durch die Präparation im Elektronenmikroskop immer verkürzt erscheinen und Längenmessungen in Folge dessen sehr ungenaue Werte ergeben, sind die einzelnen Plasmidabschnitte in Prozentzahlen angegeben (100% = 56.2 kb = $18.7 \mu m$).

Der Bereich zwischen den Insertionen $ISR1_A$ und $ISR1_T$ umfaßt mit 9.0 kb ($= 3.0 \mu m$) nach dieser Umrechnung 16.0%, der Abschnitt zwischen $ISR1_T$ und $ISR1_K$ 32.35% (18.2 kb = $6.07 \mu m$) und die Entfernung zwischen $ISR1_K$ und $ISR1_A$ 45.51% (25.55 kb = $8.51 \mu m$) der Gesamtmoleküllänge.

Die Elemente $ISR1_A$ und $ISR1_K$ sind in gleicher Orientierung inseriert, während die Sequenz in Tra3, $ISR1_T$, gegenläufig zu diesen beiden Insertionen gerichtet ist. Die Polarität der Insertionen ist in Abb.25 durch Pfeilspitzen markiert.

Auf Grund dieser Struktur ist in Homoduplex-Experimenten durch Paarung invers inserierter ISR1-Elemente die Ausbildung von zwei Renaturierungsmustern zu erwarten:

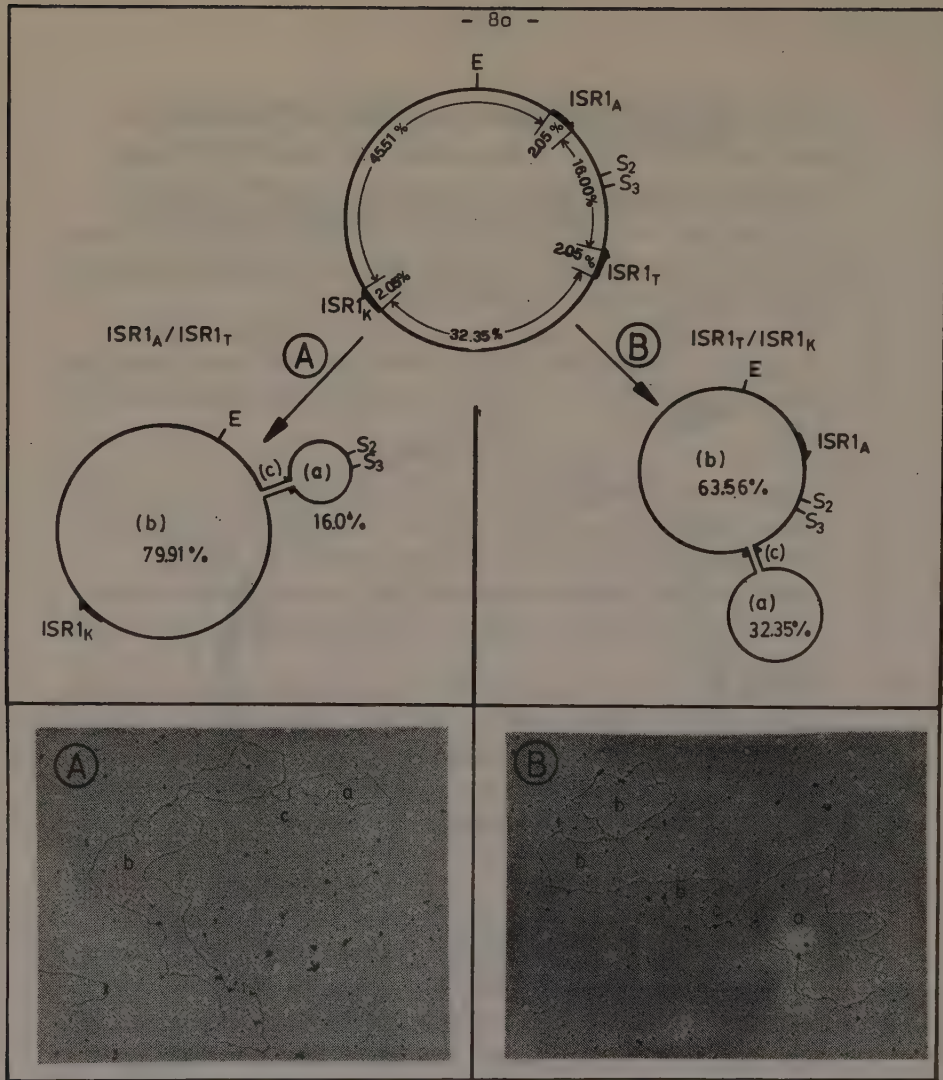


Abb.25: Homoduplexmolekül des Plasmids RP4-5.82 (Ap^S, Km^S, Tc^R, Tra^+).

Das Schema im oberen Teil der Abbildung zeigt die auf Grund der Restriktionsanalyse zu erwartenden Renaturierungsmuster. Die $ISR1$ -Insertionen sind durch Pfeile dargestellt, deren Spitzen jeweils die $BamHI$ -Enden der $ISR1$ -Sequenzen kennzeichnen. Die einzelnen Plasmidabschnitte sind in Prozenten wiedergegeben.

Im unteren Teil sind die im Elektronenmikroskop beobachteten Molekülstrukturen abgebildet. Die sich ergebenden Prozentanteile für die Einzelstrangschleifen stimmen recht gut mit den theoretischen Größen überein. Folgende Werte ließen sich ermitteln: Molekül A: kleine Schleife a = 16%; große Schleife b = 80%; Molekül B: kleine Schleife a = 32,5%; große Schleife b = 63,5%.

Das Negativ der elektronenmikroskopischen Aufnahme wurde von Burkardt zur Verfügung gestellt.

Möglichkeit (A): $ISR1_A/ISR1_T$

Das $ISR1$ -Element in $Tn1$ ($ISR1_A$) hybridisiert mit der homologen, aber gegenläufig orientierten Sequenz in $Tra3$ ($ISR1_T$). Dabei sollte sich folgende Struktur ausbilden: die beiden $ISR1$ -Insertionen paaren sich zu einem kurzen, doppelsträngigen (ds) Abschnitt von 1.15 kb (c), der das Plasmid in zwei ungleich große Einzelstrang(ss)-Schleifen teilt. Die Schleife (a) stellt den kurzen Abschnitt dar, der die Tc -Resistenz-Genregion (markiert durch die zwei SmaI-Stellen S_2 und S_3) trägt. Ihre Größe sollte nach den Ergebnissen der Restriktionsanalyse 16% der Gesamtplasmidlänge betragen. Die große Schleife (b) reicht von $ISR1_T$ über $ISR1_K$ bis zur Insertion von $ISR1_A$. Die theoretische Länge für diesen Einzelstrangbereich läßt sich mit etwa 80% errechnen.

Möglichkeit (B): $ISR1_T/ISR1_K$

Das Element in $Tra3$ ($ISR1_T$) paart sich mit der homologen, umgekehrt orientierten Insertion $ISR1_K$.

In diesem Fall sollten die durch den Doppelstrang (c) getrennten Einzelstrang-Abschnitte Plasmidanteile von 32.35% (Schleife a) und 63.56% (Schleife b) darstellen.

Beide Molekülstrukturen konnten in dem Selbsthybridisierungsversuch beobachtet werden (Abb.25, untere Hälfte).

Zur Berechnung der Einzelstrangschleifen wurde zuerst die Konturlänge des Plasmids RP4-5.82 elektronenmikroskopisch bestimmt. Durch Messung von 45 nicht denaturierten Molekülen ließ sich eine Länge von $18.84 \mu m \pm 0.42$ ermitteln, ein Wert, der recht gut mit dem restriktionsanalytischen Ergebnis ($56.2 \text{ kb} = 18.7 \mu m$) übereinstimmt.

Die im Elektronenmikroskop gemessenen Einzelstranglängen der Homoduplexmoleküle wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt und der prozentuale Anteil der ss-Schleifen errechnet.

Die so bestimmten Prozentanteile (vergl. Legende zu Abb.25) stimmen im wesentlichen mit den Werten, die auf Grund der Restriktionsanalyse erwartet wurden, überein.

Durch dieses Homoduplex-Experiment wurden sowohl die Identität der drei Insertionen, als auch ihre Integrationsstellen und die verschiedenen Orientierungen elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht und dadurch die Befunde der Restriktionsanalyse bewiesen.

D.III.: MUTAGENE AKTIVITÄT VON ISR1 IN RHIZOBIUM LUPINI

In dem vorangegangenen Kapitel wurde der Nachweis dafür erbracht, daß die in *R.lupini* beobachteten RP4-Mutationen auf molekularer Ebene entweder durch ISR1-Insertionen oder durch damit verbundene Deletionen erklärt werden können. Darüber hinaus wurde deutlich, daß nicht alle ISR1-Insertionen in einer phänotypischen Veränderung des RP4-Plasmids zum Ausdruck kommen.

Dabei wurden die isolierten Mutanten unabhängig voneinander und von ihrer Herkunft analysiert.

Um einen Überblick über die Vielfalt der ISR1-induzierten Veränderungen am RP4-Plasmid zu erhalten, werden in diesem Kapitel Mutanten miteinander verglichen, die in ein- und demselben *R.lupini*-Wirt entstanden.

Durch Gegenüberstellung von mehreren Einzelereignissen, die parallel oder nacheinander stattgefunden haben, sollte ein Einblick in Vorgänge möglich sein, die durch ISR1 am RP4-Molekül ausgelöst werden.

Gleichzeitig spiegelt diese Analyse die Aktivität von ISR1 bezüglich des RP4-Plasmids wider.

Die für die Untersuchung verwendeten Plasmide wurden zwar, wie auch in D.II aus *E.coli* isoliert, ihre Molekülstrukturen stellen aber ein Abbild der in *R.lupini* abgelaufenen Prozesse dar.

Die auf Grund dieser Strukturen getroffenen Aussagen charakterisieren daher das Verhalten von ISR1 in *Rhizobium lupini* und erlauben keine Aussagen über Eigenschaften in *Escherichia coli*.

Insgesamt werden drei Beispiele vorgestellt, die veranschaulichen sollen, wie und in welchem Ausmaß das ISR1-Element in *R.lupini* am RP4-Molekül "arbeitet".

III.1 : Beispiel 1: VERLUST DER Ap^R DURCH FORTSCHREITENDE DELETIONEN NACH INSERTION VON ISR1

Der Zusammenhang zwischen den Plasmiden RP4-3.2, RP4-5.2 und RP4-5.3, die alle in dem Stamm M137-6 entstanden, ist in Abb.27.1 schematisch dargestellt.

Vom *R.lupini*-Stamm 1-491(RP4) wurde eine Km^S Segregante gewonnen (M137-6) und mit *E.coli* gekreuzt. Eine Ap^R, Km^S, Tc^R Rezipientenkolonie wurde isoliert und das auf diese Zelle übertragene Plasmid RP4-3.2 untersucht. Die Fragmentanalyse dieser Mutante ist in D.II.2.2 beschrieben.

Gleichzeitig wurde der Stamm M137-6 durch Stempeltechniken auf Verlust einer weiteren Antibiotika-Resistenz getestet. Zwei Ap^S Einzelkolonien (M137-6.1, M137-6.2) wurden isoliert und ebenfalls mit *E.coli* gekreuzt. Die aus den Transkonjuganten gewonnenen Plasmidmutanten wurden mit RP4-5.2 und RP4-5.3 bezeichnet.

Im folgenden soll nun das Restriktionsverhalten der beiden Ap^S Mutanten mit dem des Ap^R Plasmids RP4-3.2 verglichen werden.

Unterschiede werden bereits im Fragmentmuster der EcoRI/HindIII-Verdauung sichtbar (Abb.26a): die Abstände zwischen der EcoRI- und der ISR1-spezifischen HindIII-Stelle (Bande EH_A) werden in der Reihenfolge RP4-3.2, RP4-5.2, RP4-5.3 immer kürzer. Diese Beobachtung spricht für eine Deletion in diesem Molekülabschnitt.

Genauere Aussagen ergeben sich aus den PstI-Spaltungen der Mutanten, die in Abb.26b dargestellt sind. In Plasmid RP4-5.2 ist die Bande P4b auf 1.25 kb verkürzt. Daraus läßt sich eine Deletion von 0.2 kb in Richtung der Restriktionsstelle P_1 ableiten.

Im Bandenmuster der Mutante RP4-5.3 fehlt das Fragment P4b vollständig, erklärbar durch die Eliminierung der PstI-Stelle P_1 .

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist in Abb.27.2 gezeigt, die die SmaI-Fragmente S3 der drei Plasmide miteinander vergleicht.

Abb.26: Fragmentmuster der Plasmidmutanten RP4-3.2 (1)
RP4-5.2 (2) und RP4-5.3 (3).

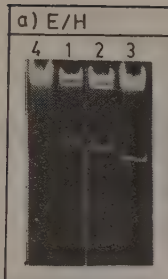


Abb.26a: Doppelverdauung
mit EcoRI und HindIII im
Vergleich zu RP4 (4).
0,9% Agarose, 80V, 120mA,
2,5 Std.

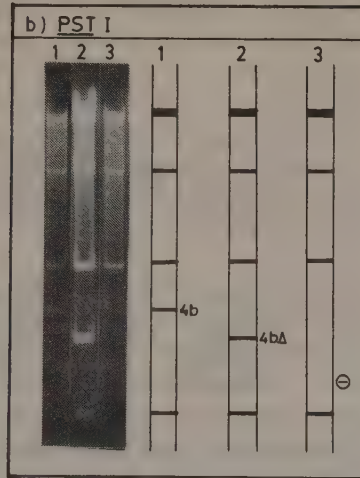


Abb.26b: Spaltung mit dem
Enzym PstI.
1% Agarose, 80V, 120mA,
2,5 Std.

In Plasmid RP4-3.2 ist das Element ISR1 nahe der Position B außerhalb des Gens für Ampicillin-Resistenz integriert und ist ohne Einfluß auf die Expression dieser Resistenz-eigenschaft.

Der Verlust der Ap-Resistenz in RP4-5.2 und RP4-5.3 ist auf eine Deletion in Richtung des Ap-Gens zurückzuführen, die am HindIII-Ende der Insertion beginnt.

In Plasmid RP4-5.2 umfaßt diese Deletion 0,2 kb und entfernt einen Teil der Resistenzdeterminante; in RP4-5.3

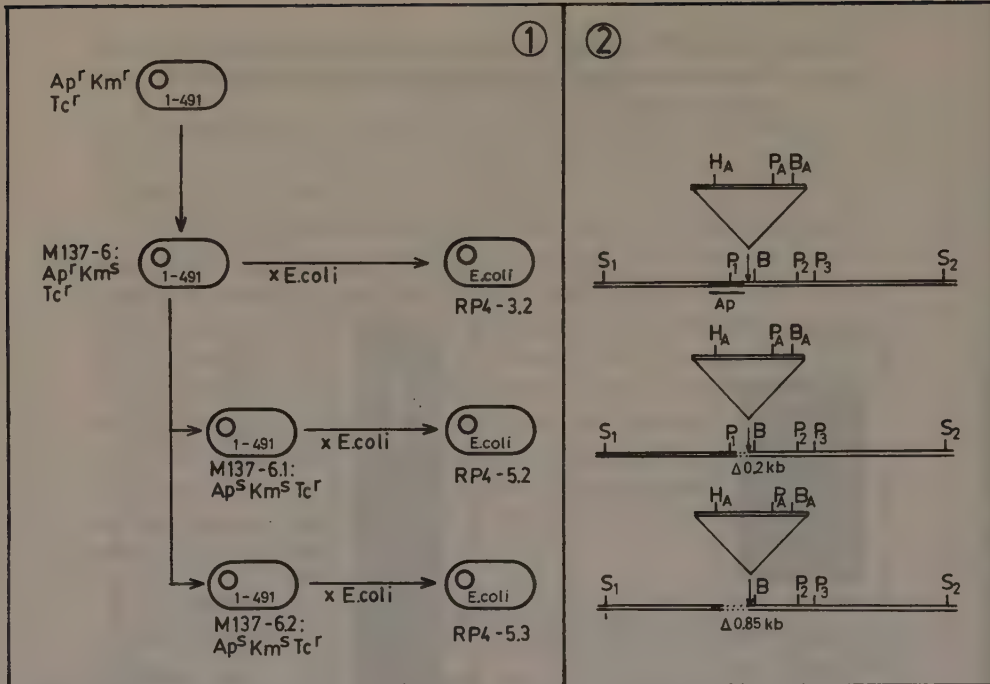


Abb. 27.1: Herkunft und Zusammenhang der Plasmide RP4-3.2, RP4-5.2 und RP4-5.3 (Erklärung siehe Txt).

Abb. 27.2: Vergleich der SmaI-Fragmente S3:

RP4-3.2 (Ap^r): Insertion von ISR1_A in Tn1, ohne Deletion

RP4-5.2 (Ap^S): ISR1_A + Deletion von 0.2 kb in Richtung P₁

RP4-5.3 (Ap^S): ISR1_A + Deletion von 0.85 kb einschließlich P₁

sind 0.85 kb RP4-DNA, einschließlich der PstI-Stelle im bla-Gen (P₁) verloren.

Diese drei Mutanten, im Zusammenhang betrachtet, vermitteln den Eindruck, daß Deletionen erst nach erfolgter ISR1-Integration entstehen, und daß diese Deletionen stufenweise fortschreiten können.

III.2 : Beispiel 2: AUSMASS DER ISR1-STIMULIERTEN DELETIONEN

Ähnlich wie in Beispiel 1 erfolgte die Isolierung des Plasmids RP4-5.4. Der Stamm M137-5, der ein Ap^S RP4-Plasmid beherbergt, wurde einerseits mit E.coli gekreuzt und aus einer Rezipientenzelle das Ap^S Plasmid RP4-2.3 isoliert, das bereits in D.II.1 vorgestellt wurde.

Zum anderen wurden M137-5-Einzelkolonien auf verschiedene Antibiotikaplatten überstempelt. Eine dieser Kolonien zeigte keine Km-Resistenz mehr (M137-5.1). Da sich die verbliebene Tc-Resistenz auch als transfernegativ erwies, wurde das Plasmid durch Transformation auf E.coli übertragen. Die aus einer der Transformanten isolierte Mutante RP4-5.4 zeigt im Vergleich der Fragmentmuster weitreichende Veränderungen zu Plasmid RP4-2.3.

Die in Abb.28 dargestellten Verdauungen mit EcoRI, HindIII und BamHI demonstrieren die Eliminierung von großen Teilen an RP4-DNA: während RP4-2.3 bei HindIII- und BamHI-Verdauungen jeweils zwei annähernd gleich große Fragmente (1,2) liefert, ist in Plasmid RP4-5.4 in beiden Fällen das erste Fragment, das keinen EcoRI-Schnitt besitzt, stark verkürzt (1'). Daneben fehlt das durch Insertion von ISR1 in Nähe der Km-Resistenzdeterminante hervorgerufene HindIII-Segment von 1,5 kb (Bande 3 in Abb.28b); dies weist auf eine Deletion in Richtung des HindIII-Schnittes H hin.

Auch die in SmaI- und PstI-Verdauungen fehlenden Fragmente (Abb.29) spiegeln den Verlust von RP4-DNA wider. An die Stelle von Fragment S1 tritt ein etwas größeres Fragment S1+, das eine PstI-Stelle besitzt. Es fehlen die Banden S2 und S4, Fragment S3 ist stark nach unten verschoben (S3Δ) und wird ebenfalls von PstI geschnitten.

Die aus diesen und anderen Verdauungen resultierende Restriktionskarte für RP4-5.4 ist in Abb.30 im Vergleich zu Plasmid RP4-2.3 gezeigt.

Es sind alle ursprünglichen PstI-Stellen des RP4-Plasmids verloren, die zwei vorhandenen PstI-Schnitte sind durch die beiden ISR1-Insertionen eingeführt.

Abb.28: Einfach- und Doppelverdauungen der Mutanten RP4-2.3 (1) und RP4-5.4 (2) mit den Enzymen HindIII, BamHI und EcoRI.

Abb.28a: Verdauung mit BamHI (B) **Abb.28b:** Spaltung mit HindIII(H) und EcoRI/BamHI (EB) und EcoRI/HindIII (EH)

Für beide Gele gilt: 0.7% Agarose, 150mA, 75V, 4.75 Std.

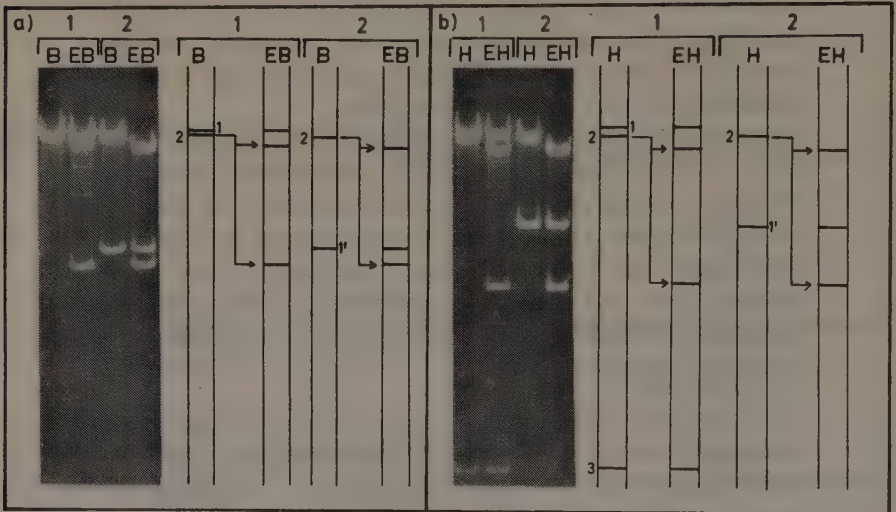
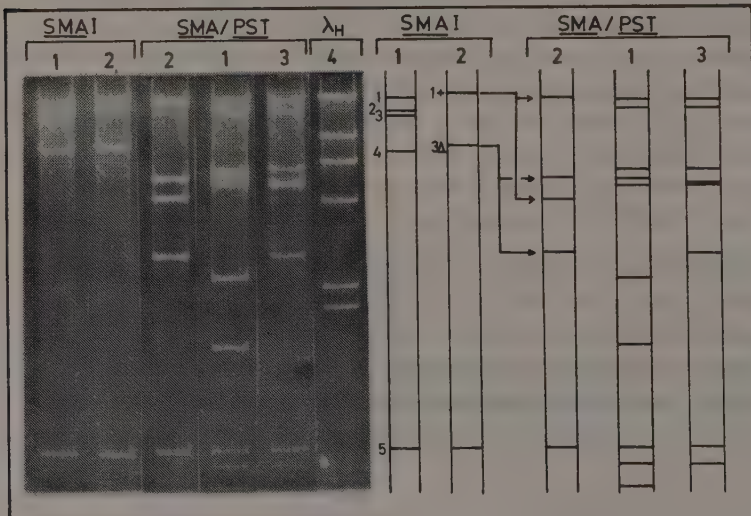


Abb.29: Fragmentmuster von RP4-2.3 (1) und RP4-5.4 (2) bei Spaltung mit SmaI und Nachverdauung mit PstI (Sma/Pst). Zum Vergleich ist in Spalte 3 Sma/Pst-verdaute RP4-DNA, in Spalte 4 das HindIII-Muster des λ -Phagen abgebildet. 1% Agarose, 120mA, 80V, 2.5 Std.



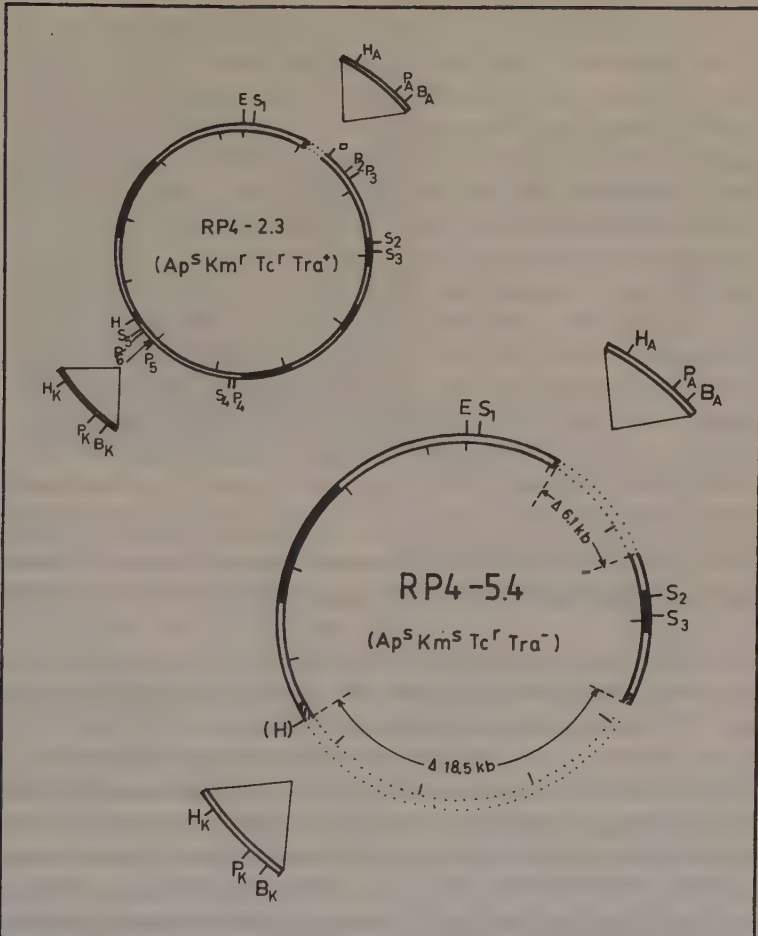


Abb. 30: Vergleich der Restriktionskarten der Plasmide
 RP4-2.3 (Ap^S , Km^r , Tc^r , Tra^+) und
 RP4-5.4 (Ap^S , Km^S , Tc^r , Tra^-).

RP4-2.3 wurde nach Konjugation mit *R. lupini* M137-5 (Ap^S) aus *E. coli* isoliert. Plasmid RP4-5.4 stammt aus einer Km^S Segregante des Stammes M137-5 und wurde durch Transformation auf *E. coli* übertragen. In Folge der Deletionen ist dieses Molekül auf 57% der ursprünglichen RP4-Größe reduziert (Gesamtlänge: 35.1 kb = 11.7 μ m).

Die in RP4-2.3 auftretende Deletion in Tn1 hat sich in RP4-5.4 in Richtung der Tc-Resistenzdeterminante um ca. 5.2 kb erweitert. Die zweite Deletion, die in dieser Mutante auftritt, hat eine Gesamtlänge von 18.5 kb und verursacht sowohl die Km-Sensitivität als auch die Transfernegativität. Sie beginnt innerhalb der Transferregion Tra3 und reicht über Tra2 bis zur HindIII-Stelle innerhalb der Km-Resistenzdeterminante oder schließt diese mit ein. Geht man davon aus, daß in RP4-5.4 die Insertion ISR1_K an gleicher Stelle integriert ist wie in RP4-2.3 (zwischen P₅ und P₆), muß man einen bidirektionalen Deletionsvorgang fordern, der an beiden Enden des ISR1-Elementes beginnt und in einer Richtung ca. 17 kb, in der anderen Richtung ungefähr 1.5 kb RP4-DNA eliminiert. Es bleibt allerdings unklar, ob die entgegengerichteten Deletionsvorgänge gleichzeitig abliefen oder unabhängig voneinander zu verschiedenen Zeitpunkten auftraten.

Andere Interpretationsmöglichkeiten für das Zustandekommen dieser Deletion werden in Teil E.I dieser Arbeit diskutiert.

Die in Abb.30 widergegebene Struktur konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bewiesen werden. Abb.31 zeigt das Homoduplexmolekül der Mutante RP4-5.4.

Da die beiden ISR1-Elemente identisch und in umgekehrter Orientierung integriert sind, können sie miteinander hybridisieren und bilden eine kurze doppelsträngige DNA-Region von 1.15 kb Länge (Pfeil c), die das Plasmid in zwei einzelsträngige Abschnitte teilt. Die kleine Schleife (a) stellt den RP4-Teil dar, der die Tetracyclin-Resistenz trägt, während die große Schleife (b) durch die restliche RP4-DNA gebildet wird. Einzelheiten sind der Legende zu Abb.31 zu entnehmen.

Auffallend ist die durch die Rückfaltung der ISR1-Elemente entstehende transposonähnliche Struktur der Tc-Resistenzdeterminante.

Es soll in diesem Zusammenhang nur kurz erwähnt werden, daß die Translocierbarkeit der Tc-Resistenz getestet wurde. Verschiedene Replikons - P1Cmts, F'(lac,pro), ColE1 - wurden

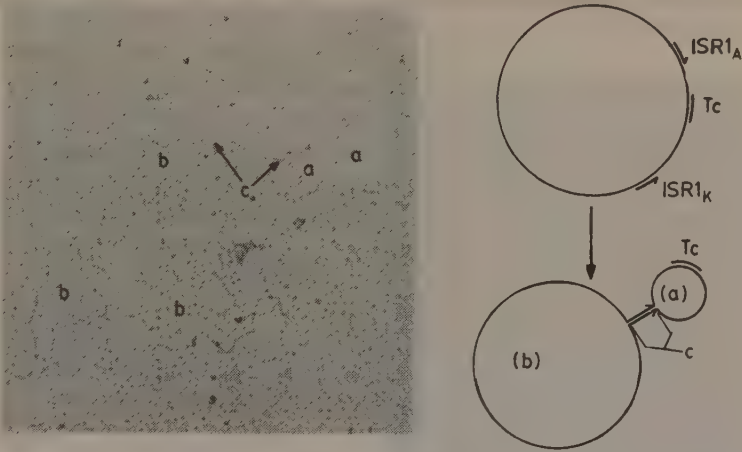


Abb.31: Homoduplexmolekül der Mutante RP4-5.4 (Ap^S, Km^S, Tc^R, Tra^-)

Die RP4-Mutante RP4-5.4 (Gesamtlänge 35.1 kb = 100%) trägt zwei Insertionen, $ISR1_A$ in $Tn1$ und $ISR1_K$, verbunden mit einer Deletion von 18.5 kb. Die beiden $ISR1$ -Elemente sind in gegenläufiger Orientierung integriert (Pfeilspitzen im Schema markieren jeweils das BamHI-Ende der Insertion). Sie bilden bei Selbsthybridisierung eine kurze, doppelsträngige Region (c), die das Molekül in zwei Einzelstrangschleifen teilt.

Nach den Ergebnissen der Restriktionsanalyse ergibt sich für die kleine Schleife (a) eine Länge von 7.15 kb (= 20.4% der Gesamtlänge), und für den großen Einzelstrangabschnitt eine Länge von 25.65 kb (= 73.1%).

Im Elektronenmikroskop wurde die Länge der Schleife (a) mit 20.2%, die Größe der Schleife (b) mit 73.2% vermessen. Die doppelsträngige Region (c) diente dabei als interner Standard.

(Präparation und elektronenmikroskopische Darstellung des Homoduplex-Moleküls von H.J.Burkardt)

in RP4-5.4-tragenden *E.coli*-Stämmen vermehrt und anschließend auf Erwerb des Tc -Resistenzmarkers untersucht. In keinem Fall war ein positives Ergebnis (= Translocation der Tc^R) nachweisbar.

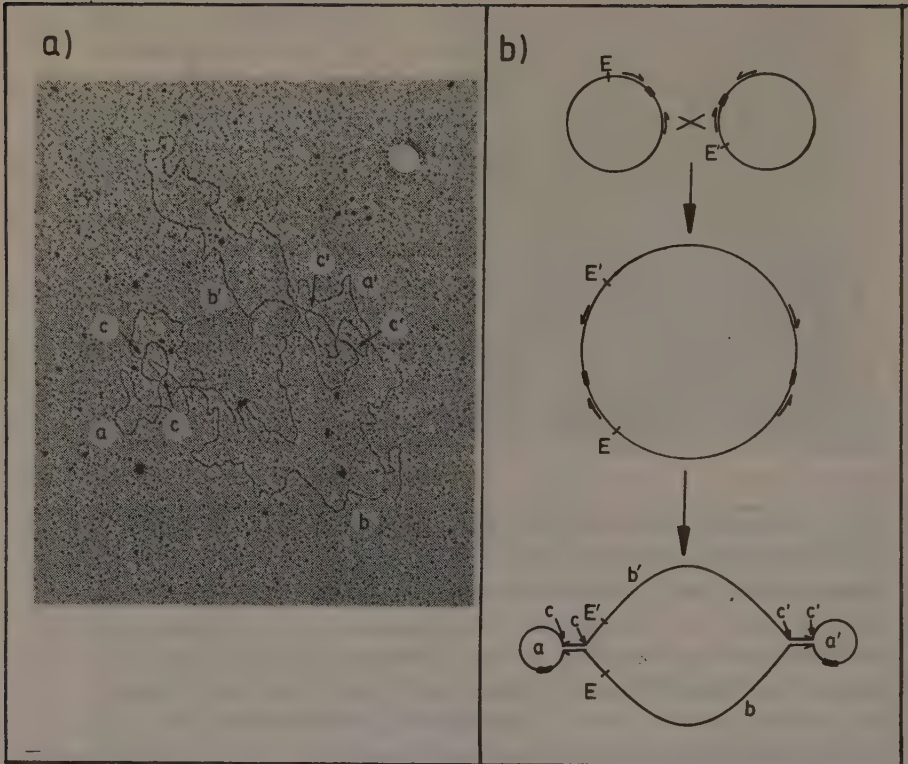


Abb.32: Homoduplexstruktur (a) und Entstehung (b) eines RP4-5.4-Dimeren.

Das abgebildete Homoduplexmolekül ist zurückzuführen auf ein RP4-5.4-Dimeres, das durch Rekombination entstehen kann. In Teil b) der Abbildung ist eine Rekombination zwischen zwei ISR1-Elementen angenommen. Als Orientierungshilfe sind die EcoRI-Stellen (E bzw. E') des RP4-Moleküls eingezeichnet.

Durch Rückfaltung von jeweils zwei der insgesamt vier ISR1-Elementen bildet sich die im Elektronenmikroskop beobachtete Struktur aus (Teil a). Die ds-Region zwischen den Pfeilen c bzw. c' entspricht den hybridisierten ISR1-Sequenzen, die kleinen Schleifen a und a' stellen die kurzen ss-Bereiche dar, die die Tc^r (markiert durch ■) tragen, die langen Einzelstränge b und b' sind auf die übrige nicht homologe RP4-DNA zurückzuführen.

(Präparation und elektronenmikroskopische Darstellung von H.J. Burkardt).

In einigen Fällen waren im Elektronenmikroskop Strukturen zu beobachten, die als Homoduplex-Moleküle von RP4-5.4-Dimeren interpretiert werden können (Abb.32).

Es treten zwei doppelsträngige DNA-Regionen von jeweils 1.15 kb Länge (zwischen den Pfeilen c bzw. c') auf, die sich an einem Ende zu kleinen (ca. 7 kb) ss-Schleifen öffnen (Schleifen a und a'). Verbunden werden die ds-Bereiche durch zwei Einzelstränge (b und b') von jeweils ungefähr 25 kb Länge.

III.3 : Beispiel 3: VIELFALT GLEICHZEITIG AUFTRETENDER ISR1-INDUZIERTER VERÄNDERUNGEN DES RP4-MOLEKÜLS

Als drittes Beispiel sollen hier die aus dem *R.lupini*-Stamm M137-13 isolierten Plasmidmutanten vorgestellt werden. Der Stamm M137-13 trägt ein RP4-Plasmid, das noch alle drei Resistenzmarker besitzt, und zeigt in Konjugations-experimenten mit *E.coli* einen sehr reduzierten RP4-Transfer von 3×10^{-9} (vergl. D.I.2.2.1).

Aus diesem Stamm wurden verschiedene Plasmidmutanten isoliert (vergl. auch Schema in Abb.37):

- ein nach Konjugationstransfer aus *E.coli* isoliertes Plasmid mit der Markierung Ap^r , Km^r , Tc^r , Tra^+ wurde RP4-13 genannt.
- In einem Transformationsversuch wurde die extrachromosomale DNA aus M137-13 auf *E.coli* übertragen (vergl. D.I.3). Die von den Rezipienten erworbenen Plasmide unterschieden sich sowohl hinsichtlich ihrer Transfereigenschaften als auch ihres Resistenzspektrums.
Isoliert wurde das Plasmid RP4-13.1 (Ap^r , Km^r , Tc^r , Tra^-), das bereits in D.II.4.2 charakterisiert wurde, und eine Ap^s Mutante, die die Bezeichnung RP4-13.2 erhielt.
- Aus dem Stamm M137-13 wurde eine Ap^s Segregante (M137-13.1) isoliert und deren Plasmid-DNA ebenfalls durch Transformation auf *E.coli* übertragen (vergl. C.I.3). Die Transformanten zeigten unterschiedliche Plasmidphänotypen; isoliert wurde ein Tc^r , Tra^+ Plasmid, bezeichnet als RP4-13.5.

Die Fragmentmuster dieser alle aus dem gleichen *R.lupini*-Wirt M137-13 stammenden Plasmide sollen in folgender Studie miteinander verglichen werden.

Die daraus resultierenden Restriktionskarten sind in Abb.37 zusammengefaßt.

Abb.33 gibt einen Überblick über die Verteilung der HindIII-Restriktionsstellen in den Plasmiden RP4-13, RP4-13.1, RP4-13.2 und RP4-13.5.

Aus den drei HindIII-Fragmenten in RP4-13.1 (Spalte 2) und RP4-13.2 (Spalte 3) lassen sich zwei ISR1-Insertionen ableiten, während die Doppelbande in RP4-13 (Spur 1) und RP4-13.5 (Spur 4) für eine Insertion gegenüber der RP4-HindIII-Stelle H, also in Tn1 spricht.

Unterschiedliche Spaltmuster für die vier Plasmide ergeben sich auch aus den Verdauungen mit SmaI und PstI, die in Abb.35 und Abb.36 wiedergegeben sind.

Mutante RP4-13 zeigt in Abb.35 (Spur 1) ein stark verkürztes SmaI-Fragment S3 (S3A); das heißt, daß in diesem Bereich eine relativ große Deletion zu vermuten ist. In der PstI-Verdauung dieses Plasmids (Abb.36, Spur 1; Abb.34, Spur 1) fehlen im Zusammenhang mit dieser Deletion die Banden P4a und P6, die durch Eliminierung der Schnittstellen B, P₂ und P₃ verloren gehen. Die Insertion von ISR1_A im Tn1-Transposon dieser Mutante ist demnach verbunden mit einer Deletion von ca. 3,65 kb in Richtung der Tc-Resistenzgenregion. In Richtung des bla-Gens geht keine RP4-DNA verloren, so daß die Ap-Resistenz vollkommen erhalten bleibt.

Das Plasmid RP4-13 gehört zu den als Tra^V bezeichneten Mutanten (vergl. D.I.2.2.2). Im Kapitel D.II.2.4 wurde ein anderer Vertreter dieser Gruppe, Plasmid RP4-12, restriktionsanalytisch untersucht. Weder in RP4-13 noch in RP4-12 konnten Veränderungen festgestellt werden, die die Transfernegativität dieser Plasmide innerhalb *R.lupini* bzw. den reduzierten Transfer von *R.lupini* nach *E.coli* erklären würden.

Die Ursache hierfür wird in E.IV.3 diskutiert.

In der Mutante RP4-13.5 wurde auf Grund des HindIII-Spaltmusters ebenfalls eine ISR1-Insertion in Tn1 vermutet, die

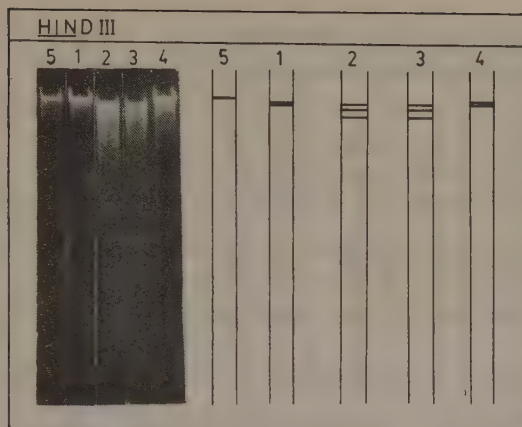


Abb.33: HindIII-Muster der RP4-13-Mutanten.

- (1) RP4-13
- (2) RP4-13.1 (Tra^-)
- (3) RP4-13.2 ($\text{Ap}^S, \text{Tra}^-$)
- (4) RP4-13.5 (Ap^S, Km^S)
- (5) RP4

1% Agarose, 140 mA, 90V, 2 Std.

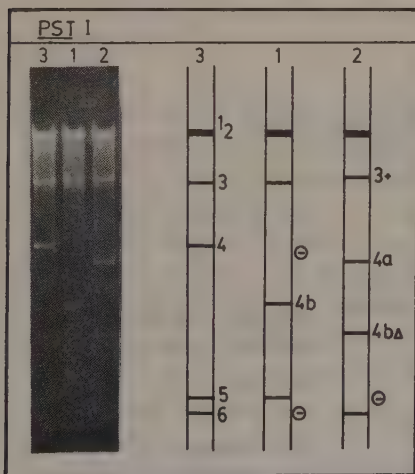


Abb.34: Verdauung von RP4-13 (1) und RP4-13.5 (2) mit PstI.

Spur (3) zeigt das PstI-Muster des RP4-Plasmids.

1% Agarose, 120mA, 80V, 2,5 Std.

auch in der Verlängerung des SmaI-Fragmentes S3 (S3+ in Abb.35, Spur 4) zum Ausdruck kommt. Die SmaI-Verdauung zeigt aber auch Veränderungen in der Gegend der Km^R -Determinante an, in Übereinstimmung mit der Kanamycinsensitivität dieses Plasmids: es fehlt die Bande S4, das Fragment S1 ist deutlich vergrößert (S1+). Im Zusammenhang damit stehen die Vergrößerung der PstI-Bande P3 (P3+ in Abb.36, Spur 4) und das Fehlen des Fragmentes P5 (Abb.34, Spur 2).

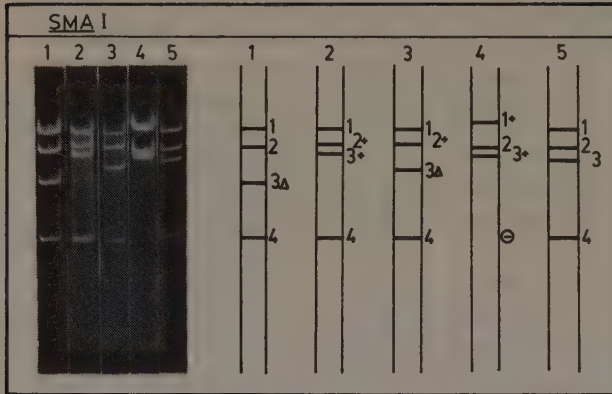


Abb.35: SmaI-Spaltmuster der Mutanten

- (1) RP4-13
- (2) RP4-13.1
- (3) RP4-13.2
- (4) RP4-13.5

In Spalte (5) ist SmaI-verdaute RP4-DNA aufgetragen.

0.7 % Agarose, 100mA, 80V, 3 Std.

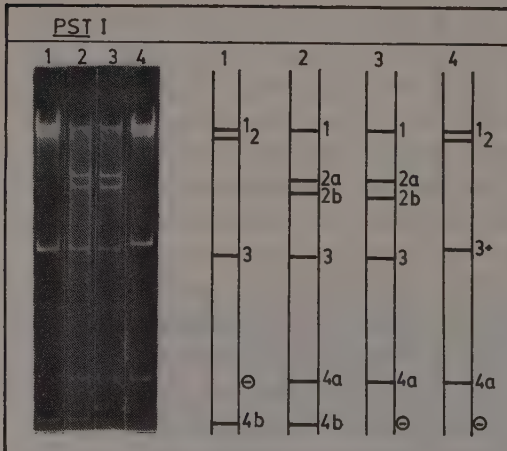


Abb.36: Verdauung der RP4-13-Plasmide mit PstI.

- (1) RP4-13
- (2) RP4-13.1
- (3) RP4-13.2
- (4) RP4-13.5

0.7% Agarose, 100mA, 80V, 3 Std.

Diese Spaltmuster sind zurückzuführen auf die Insertion von $ISR1_K$ in unmittelbarer Nähe des HindIII-Schnittes, verbunden mit einer Deletion, durch die die Restriktionsstellen P_5 , P_6 und S_5 verloren gehen. Das Fragment $P3+$ stellt den Abschnitt P_4^{PK} dar.

Auch die Insertion in $Tn1$ ist mit einer Deletion gekoppelt.

Aus der Verkürzung des Fragments $P4b$ (Abb.34, Spur 2) ist der Verlust von ca. 300 bp in Richtung der Ampicillin-Resistenzdeterminante abzuleiten, der zur Inaktivierung des *bla*-Gens führt.

Die beiden $ISR1$ -Insertionen in dieser Mutante sind gegenläufig integriert. Plasmid $RP4-13.5$ zeigt damit die gleiche Molekülstruktur wie die Mutante $RP4-5.81$ (vergl. D.II.2.3). Beide Plasmide besitzen zwar den gleichen Phänotyp (Ap^S , Km^S , Tc^R , Tra^+), wurden aber vollkommen unabhängig voneinander isoliert.

Die Mutanten $RP4-13.1$ (Ap^R , Km^R , Tc^R , Tra^-) und $RP4-13.2$ (Ap^S , Km^R , Tc^R , Tra^-) zeigen in der PstI-Verdauung (Abb.36, Spalte 2 und 3) eine wesentliche Übereinstimmung, nämlich die Aufspaltung des Fragments $P2$ in die Banden $P2a$ und $P2b$. In der Restriktionsanalyse des Plasmids $RP4-13.1$ (vergl. D.II.2.4.2) konnte dieses Verhalten durch die Insertion von $ISR1$ in $Tra3$ erklärt werden. Dies trifft auch für die ebenfalls transfernegative Mutante $RP4-13.2$ zu. Die Insertion $ISR1_T$ kommt in beiden Plasmiden auch durch die Vergrößerung des SmaI-Fragments $S2$ ($S2+$ in Abb.35, Spur 2 und 3) zum Ausdruck.

Der Verlust der Ap -Resistenz in $RP4-13.2$ ist zurückzuführen auf eine Deletion in Nachbarschaft der $ISR1$ -Insertion in $Tn1$. Diese Deletion wird erkennbar in der Verkürzung des Fragments $Sma3$ ($S3\Delta$ in Abb.35, Spur 3) und im Fehlen der PstI-Bande $P4b$ (Abb.36, Spur 3). Durch diese Deletion gehen ca. 1.7 kb $RP4$ -DNA einschließlich der PstI-Stelle im *bla*-Gen, P_1 , verloren.

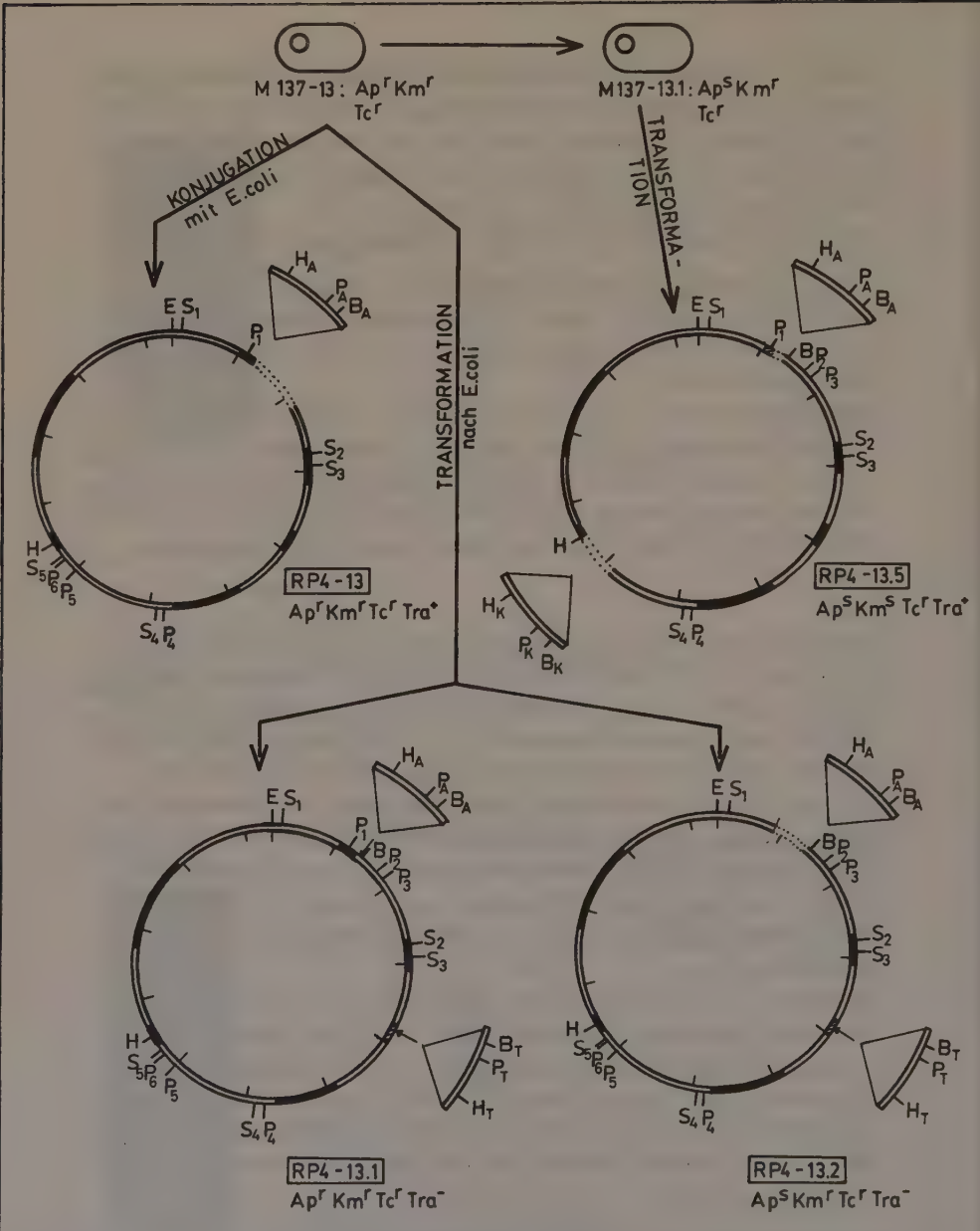


Abb. 37: Überblick über den Zusammenhang der RP4-13-Plasmidmutanten und Vergleich ihrer physikalischen Karten. Die angegebenen Transfereigenschaften beziehen sich auf das Transferverhalten in E.coli. (Erläuterung im Text)

In Abb.37 sind die physikalischen Karten der vier Plasmidmutanten, die alle aus dem Stamm *R.lupini* M137-13 isoliert wurden, dargestellt. Sie vermitteln einen Eindruck über die Vielfalt parallel ablaufender Insertions- und Deletionsprozesse im RP4-Molekül und verdeutlichen die extrem hohe Aktivität von ISR1 in *Rhizobium lupini*.

D.IV : INAKTIVITÄT VON ISR1 IN ESCHERICHIA COLI

Im vorangegangenen Kapitel D.III wurde an Hand verschiedener Beispiele gezeigt, mit welcher Häufigkeit ISR1-Insertionen im RP4-Molekül im Stamm *Rhizobium lupini* zu finden sind und dort Mutationen erzeugen, entweder durch die Integration direkt oder durch anschließende Deletionsprozesse verschiedenen Ausmaßes.

Dieses Kapitel ist nun der Frage gewidmet, ob ISR1 auch in *Escherichia coli* biologisch aktiv ist und dort Mutationsergebnisse am RP4-Molekül hervorruft.

Diese Fragestellung scheint dem Abschnitt D.I.2 zu widersprechen, in dem die RP4-Mutanten aus *R.lupini* zur Stabilisierung nach *E.coli* transferiert wurden.

Tatsächlich verhält sich eine *E.coli* (RP4::ISR1)-Kultur in Bezug auf ihren Plasmid-Phänotyp äußerst stabil. Es ist jedoch nicht von vorne herein auszuschließen, daß ISR1 auch in *E.coli* RP4-Mutationen verursacht, die lediglich auf Grund ihres seltenen Auftretens nicht erkannt werden.

Deswegen wurden in einem breit angelegten Stabilitätstest verschiedene *E.coli* (RP4::ISR1)-Stämme auf Plasmidverlust und auf Veränderungen ihres Resistenzspektrums untersucht.

IV.1 : BESTIMMUNG DER VERLUST- UND MUTATIONSRATE VON RP4::ISR1 IN ESCHERICHIA COLI

IV.1.1 : Stabilitätstest in Rec⁺- und Rec⁻-Stämmen

Verschiedene RP4::ISR1-Mutanten wurden sowohl in Rec⁺- als auch in Rec⁻- *E.coli*-Stämmen über 60 Generationen auf Verlust einzelner Resistenzmarkierungen untersucht.

Im einzelnen wurde das Experiment wie folgt durchgeführt: Als Wirt diente zum einen der Stamm CSH 51, zum anderen CSH 52, der isogen mit CSH 51 ist und sich von diesem nur durch ein defektes Rekombinationssystem unterscheidet.

Die RP4::ISR1-tragenden Stämme wurden mit einem Anfangstiter von 10^4 Zellen/ml in 10 ml LB-Medium angeimpft und bei 30°C

bis zur Stationärphase inkubiert. Von diesen Kulturen wurde der Titer bestimmt und eine 10^{-5} -Verdünnung in frisches LB-Medium angeimpft. Diese Kulturen wurden wieder bis zur Stationärphase gewachsen und wie oben behandelt.

Aus dem Zelltiter in den Anfangs- und den Stationärkulturen läßt sich die Anzahl der Teilungen, d.h. die Generationszahl errechnen.

Nach jeweils 15-16 Generationen wurden Einzelkolonien auf ihr Resistenzmuster durch Überstempeln auf Antibiotika-Platten überprüft.

Nach insgesamt 60 Zyklen wurde der Versuch abgebrochen. Da sich die Werte für die einzelnen Zwischenstufen nicht wesentlich davon unterscheiden, sind in Tabelle 7 nur die Ergebnisse aufgeführt, die die abschließenden Stempeltests der Kulturen nach 60 Generationen lieferten.

In den meisten Fällen steht das Fehlen aller ursprünglich vorhandenen Resistenzmarkierungen für die Eliminierung des ganzen Plasmids. Dies konnte durch SDS-Lyse der betreffenden Kolonien und anschließende Gelelektrophorese gezeigt werden. Was die Verlustrate betrifft, ergeben sich nur in zwei Fällen Unterschiede zum Verhalten des Wildtyp-RP4-Plasmids. Die Ap^S Mutante RP4-13.2 geht im Rec^+ -Stamm mit einer Häufigkeit von 11.8% verloren; das Tc^R Plasmid RP4-5.4 zeigt im Rec^+ -Wirt sogar eine Eliminierungsfrequenz von über 90%, die im rekombinationsdefekten Stamm CSH 52 auf ca. 11% reduziert ist.

Neu auftretende Mutationen konnten jedoch für die meisten Plasmidmutanten nicht beobachtet werden.

Eine Ausnahme bildet eine Tc^S Kolonie des Stammes CSH 51(RP4-5.81), die im Gel trotz Fehlen aller Plasmidmarker eine Plasmidbande zeigte, die im Vergleich zum ursprünglichen Plasmid etwas nach unten verschoben war. Dieses verkürzte Molekül, das keine Resistenzmarkierungen mehr zeigt, wurde mit RP4-5.81: Tc^S bezeichnet.

Ähnliche Ergebnisse wurden für eine Tc^S Kolonie des Stammes CSH 52(RP4-13.2) erhalten. Auch hier konnte in der Agarose-

Tab.7: Verlust- und Mutationsraten verschiedener RP4::ISR1-Mutanten in E.coli

Tab.7a: Stabilität im Rec⁺-Stamm CSH 51

PLASMID		Anzahl der Kolonien mit Resistenz gegen				PLASMID VERLUST	RESISTENZ VERLUST
Bezeichnung	Markierung	Ap	Km	Tc	Ges.		
RP4	Ap ^r Km ^r Tc ^r	159	159	159	160	0.62%	0%
RP4-13	Ap ^r Km ^r Tc ^r	200	200	200	200	0%	0%
RP4-13.1	Ap ^r Km ^r Tc ^r	198	198	198	200	1%	0%
RP4-13.2	Ap ^s Km ^r Tc ^r	∅	247	247	280	11.8%	0%
RP4-13.5	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	179	180	0.55%	0%
RP4-5.81	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	258 ^{a)}	262	1.15%	0.4%
RP4-5.82	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	200	200	0%	0%
RP4-5.4	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	23	300	92.3%	0%

a) In einer dieser Tc^s Kolonien wurde ein Plasmid nachgewiesen, das im Agarosegel etwas verkürzt ist (RP4-5.81:Tc^s).

Tab.7b: Stabilität im Rec⁻-Stamm CSH 52

PLASMID		Anzahl der Kolonien mit Resistenz gegen				PLASMID VERLUST	RESISTENZ VERLUST
Bezeichnung	Markierung	Ap	Km	Tc	Ges.		
RP4	Ap ^r Km ^r Tc ^r	200	200	200	200	0%	0%
RP4-13	Ap ^r Km ^r Tc ^r	199	199	199	200	0.5%	0%
RP4-13.1	Ap ^r Km ^r Tc ^r	200	200	200	200	0%	0%
RP4-13.2	Ap ^s Km ^r Tc ^r	∅	300	299 ^{b)}	300	0%	0.3%
RP4-13.5	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	200	200	0%	0%
RP4-5.81	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	300	300	0%	0%
RP4-5.82	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	300	300	0%	0%
RP4-5.4	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	357	400	10.8%	0%

b) Das Plasmid dieser Tc^s Kolonie zeigt im Agarosegel ebenfalls eine Verkürzung (RP4-13.2:Tc^s)

gelelektrophorese des Zell-Rohlysates eine etwas verkürzte Plasmidbande nachgewiesen werden. Diese Mutante erhielt die Bezeichnung RP4-13.2:Tc^S.

Beide in E.coli neu entstandenen Plasmidmutanten wurden isoliert und durch Spaltung mit Restriktionsenzymen charakterisiert (siehe D.IV.2.1).

IV.1.2 : Cycloserin-Anreicherung von Tc^S Kolonien

In einem anderen Versuch wurden RP4::ISR1-Mutanten in E.coli C bei 37°C wie oben über 60 Generationen vermehrt und anschließend durch Cycloserin auf Verlust der Tetracyclin-Resistenz selektioniert.

Dazu wurden die Kulturen in Tc-haltigem Medium bis zu einer optischen Dichte von ungefähr 0.2 angezogen.

Da Tetracyclin in die Proteinsynthese der Zellen eingreift und daher bakteriostatisch wirkt, bleiben Tc^S Bakterien, die sich eventuell in der Kultur befinden, in dem Tc-haltigen Medium lebensfähig, können sich aber nicht vermehren.

Durch Zugabe von Cycloserin (4 mM), das die Zellwandsynthese beeinträchtigt, werden alle wachsenden, also alle Tc^T Zellen abgetötet, was im Absinken der optischen Dichte zum Ausdruck kommt. Die "ruhenden" Tc^S Bakterien überleben.

Durch diese Behandlung erzielt man eine selektive Anreicherung der Tc-sensitiven Kolonien in der Größenordnung von Faktor 10⁴.

Da die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin bakteriozid wirken, kann diese Methode nicht zur Anreicherung von Ap^S oder Km^S Zellen verwendet werden.

Nach der Cycloserin-Inkubation (60-90 Minuten) wurden die Bakterien abzentrifugiert, gründlich gewaschen, in Puffer aufgenommen und auf Vollmedium ausgespatelt. Anschließend wurden die Kolonien durch Überstempeln auf Antibiotika-Platten auf ihre Resistenzeigenschaften untersucht.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

PLASMID		Anzahl der Kolonien mit Resistenz gegen				VERLUST der Tc-RESISTENZ
Bezeichnung	Markierung	Ap	Km	Tc	Ges.	
RP4	Ap ^r Km ^r Tc ^r	a) 100	99	99	100	1%
RP4-12	Ap ^r Km ^r Tc ^r	42	42	42	100	58%
RP4-13	Ap ^r Km ^r Tc ^r	29	29	29	100	71%
RP4-13.1	Ap ^r Km ^r Tc ^r	b) 76	77	77	100	23%
RP4-13.2	Ap ^s Km ^r Tc ^r	∅	83	83	100	17%
RP4-5.81	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	∅	100	100%
RP4-5.82	Ap ^s Km ^s Tc ^r	∅	∅	4	100	96%

Tab.8: Resistenzspektrum von E.coli C(RP4::ISR1)-Stämme nach Cycloserin-Anreicherung Tc^s Zellen.

Die Erklärung für die mit a) und b) markierten Kolonien ist dem Text zu entnehmen.

Das Resistenzspektrum der Tc^s Kolonien macht deutlich, daß gemeinsam mit der Tc-Resistenz auch die übrigen ursprünglich vorhandenen Resistenzeigenschaften des RP4-Moleküls verloren waren. In den Mutanten, in denen nur der Tc^r-Marker als Selektionsmerkmal vorhanden war, erbrachte die Gelelektrophorese der Zellrohlysate, daß die Tc^s Kolonien, die mit großer Häufigkeit entstanden, keine Plasmid-DNA mehr beherbergten.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß durch Cycloserin keine Tc^s Mutanten, sondern lediglich solche Zellen selektioniert wurden, die das gesamte Plasmid verloren haben.

Die in einer E.coli (RP4)-Kolonie isoliert auftretende Ampicillin-Resistenz (markiert mit a) beruht wahrscheinlich auf der Integration von Tn1 ins Chromosom, da weder ein Plasmid in dieser Kolonie nachzuweisen, noch die Ap^r durch Konjugation auf andere E.coli-Stämme übertragbar war.

Aus der Kultur E.coli(RP4-13.1) war beim Stempeltest eine Ap^s Kolonie zu beobachten (b), deren Entstehung aber nicht auf die Cycloserin-Behandlung zurückzuführen ist.

Diese neue Mutante RP4-13.1:Ap^S wurde isoliert und durch Restriktionsanalyse näher untersucht (siehe D.IV.2.2).

IV.2 : FRAGMENTANALYSE DER ISOLIERTEN RESISTENZ-MUTANTEN

Im Rahmen des Stabilitätstests konnten insgesamt drei Plasmide isoliert werden, die in E.coli ursprüngliche Resistenzmarker verloren haben:

RP4-5.81: Tc^S

RP4-13.2: Tc^S

RP4-13.1: Ap^S

In diesem Kapitel soll mit Hilfe von Restriktionsenzymen untersucht werden, worauf die neu aufgetretenen Mutationen zurückzuführen sind.

IV.2.1 : Restriktionsanalyse der Tc^S RP4-Mutanten

Das Plasmid RP4-5.81:Tc^S besitzt nach Verlust der Tc-Resistenz keine Resistenzmarkierungen mehr, während dem Plasmid RP4-13.2:Tc^S noch die Km-Resistenz erhalten ist. Für beide Mutanten wurde in der Gelelektrophorese der SDS-Lysate eine Verkürzung der Plasmidlängen beobachtet.

Im folgenden wird das Restriktionsverhalten der Tc^S Mutanten mit dem der ursprünglichen Plasmide RP4-5.81 und RP4-13.2 verglichen.

Die Fragmentmuster für RP4-13.2 und sein Tc^S Derivat sind in Abb.38 dargestellt.

Die EcoRI/PstI-Verdauung (Abb.38a) zeigt nur eine Veränderung: Fragment P2b des Tc^R Plasmids ist in der Tc^S Mutante um ca. 2.5 kb kleiner (P2b Δ). Diese Verkürzung deutet auf eine Deletion zwischen den Schnittstellen P₃ und P_T hin. In Übereinstimmung damit ist die Bandenverteilung der SmaI-Verdauung (Abb.38b); es fehlen die Fragmente S2, S3 und S5, die alle in diesem Bereich des P2b-Fragments lokalisiert sind. Dafür tritt ein großes Spaltstück S6 auf, das über dem S1-Fragment bandiert.

Die Interpretation dieser Spaltungsergebnisse ist in Abb.39

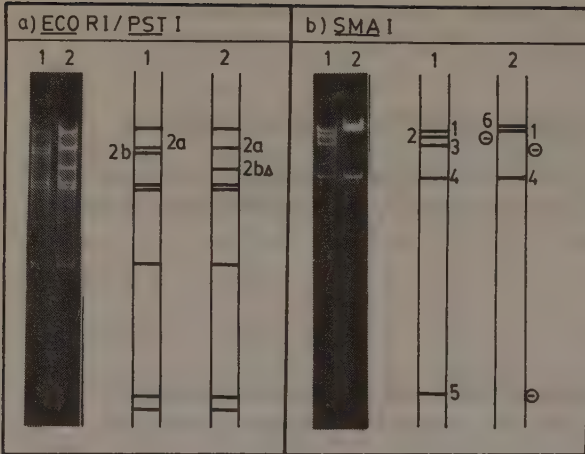


Abb.38: Vergleich der Spaltmuster von
(1) RP4-13.2 und seinem Tc^S Derivat RP4-13.2:Tc^S (2).

- a) Doppelverdauung mit EcoRI und PstI
b) Fragmentmuster der SmaI-Verdauung
1% Agarose, 150mA, 100V, 2.5 Std.

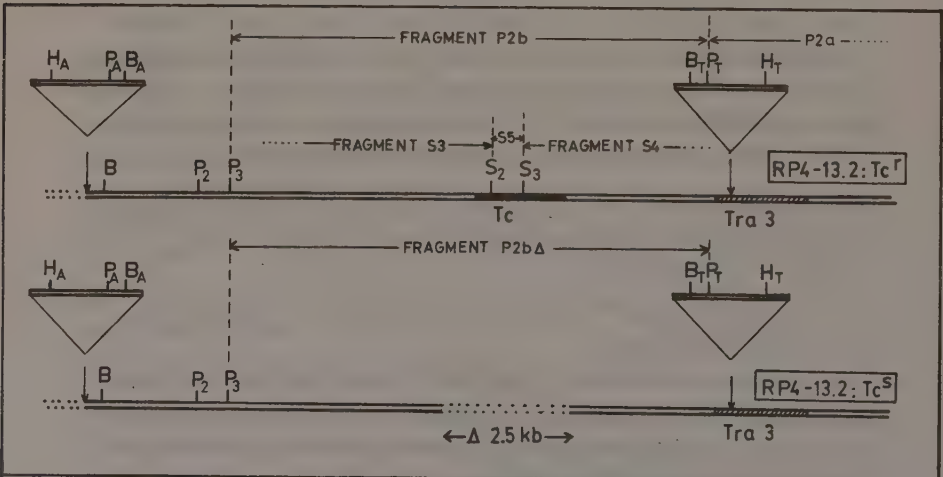


Abb.39: Schematische Darstellung der Veränderungen in der Mutante RP4-13.2:Tc^S im Vergleich zu dem Tc^R Ausgangsplasmid. Der Verlust der Tc-Resistenz ist auf eine Deletion von ca. 2.5 kb im Fragment P2b zurückzuführen, durch die die SmaI-Stellen S₂ und S₃, die beide innerhalb der Tc^R-Genregion lokalisiert sind, eliminiert werden.

dargestellt, die die betroffenen Bereiche in RP4-13.2 und RP4-13.2:Tc^S miteinander vergleicht.

Zwischen den Positionen P₃ und P_T (Fragment P2b) sind ungefähr 2.5 kb RP4-DNA deletiert, was zum Verlust der beiden SmaI-Schnittstellen S₂ und S₃ und zur Zerstörung der Tc^R-Genfunktion führt. Dadurch entsteht ein neues SmaI-Fragment S6, das von S₁ bis zur Schnittstelle S₄ reicht.

Die genaue Lokalisierung der Deletion ist durch Restriktionsanalyse nicht möglich, da in dieser Region keine geeigneten Schnittstellen vorhanden sind.

Analog ist die Situation, die sich aus den Fragmentmustern für das Tc^S Derivat von RP4-5.81 ableiten läßt.

Die Veränderungen treten in dem gleichen Molekülabschnitt auf und sind in Abb.40 schematisch dargestellt.

Auch in dieser Mutante ist der Verlust der Tc-Resistenz auf die Eliminierung der Schnittstellen S₂ und S₃ zurückzuführen. Die Deletion ergibt sich aus dem Fehlen der SmaI-Bande S5;

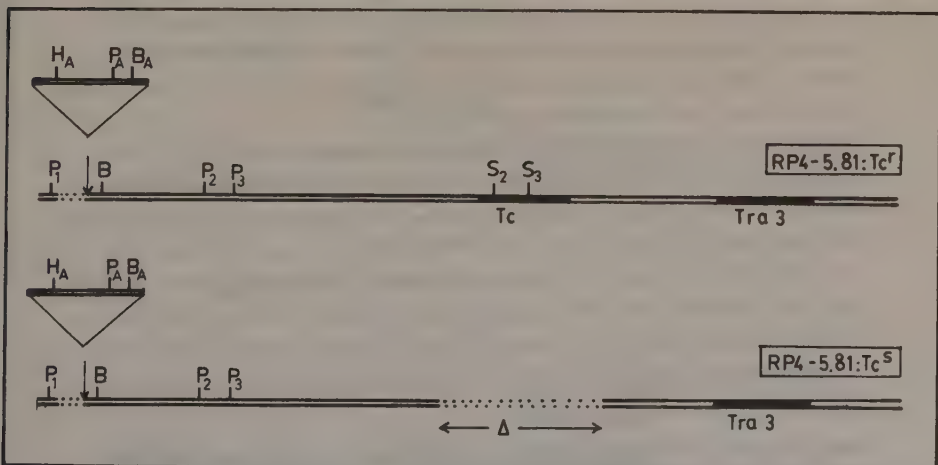


Abb.40: Gegenüberstellung der Tc-Resistenzgenregion in RP4-5.81 und in seiner Tc^S Mutante RP4-5.81:Tc^S.

Der Verlust der Schnittstellen S₂ und S₃ ist eindeutig nachzuweisen, die Ausdehnung der Deletion konnte aber durch Restriktionsanalyse nicht genau bestimmt werden.

an die Stelle der Spaltstücke S3 und S4 tritt wie in RP4-13.2:Tc^S ein SmaI-Fragment S6, dessen Molekulargewicht größer ist als das der Bande S1.

Da die Agarosegelelektrophorese in diesem Größenbereich keine exakten Aussagen über die Länge von Fragmenten zuläßt, kann die Größe der Bande S6 und damit die Ausdehnung der Deletion nicht genau bestimmt werden. Sie dürfte aber annähernd in der gleichen Größenordnung liegen wie die in Plasmid RP4-13.2:Tc^S.

Ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Tc-Resistenz und einer ISR1-Insertion ist in keiner der beiden Mutanten zu erkennen.

Diese Mutationen sind daher mit ziemlicher Sicherheit nicht auf eine Aktivität von ISR1 zurückzuführen.

IV.2.2 : Charakterisierung der Ap^S Mutante von RP4-13.1

Die PstI-Verdauung des Ap^S Derivats unterscheidet sich vom ursprünglichen Plasmid RP4-13.1 lediglich durch das Fehlen der Bande P4b, die den Abschnitt P₁P_A darstellt (Abb.41a). Da anstelle dieses Fragments keine neuen Spaltstücke auftreten, muß die im bla-Gen gelegene PstI-Stelle P₁ durch eine Deletion verloren gegangen sein.

Dies stimmt überein mit der SmaI-Verdauung (Abb.41b), die eine deutliche Verkürzung des entsprechenden Fragments S3 zeigt.

Aus der Verkleinerung der Abstände EH_A auf 5.0 kb bzw. EP_A auf 5.55 kb, wie sie in entsprechenden Verdauungen zu beobachten ist, resultiert eine Deletion von etwa 1.6 kb, die vom HindIII-Ende der ISR1_A-Insertion aus startet und das Ap-Resistenzgen zusammen mit der Restriktionsstelle P₁ zerstört (Abb.42).

Der Verlust der Ap-Resistenz in der aus E.coli isolierten Mutante RP4-13.1:Ap^S steht demnach in direktem Zusammenhang mit der Insertion ISR1_A und erfolgt nach dem gleichen Mechanismus, wie er an vielen Ap^S Mutanten aus R.lupini beobachtet wurde.

Abb.41: Vergleich der Spaltmuster von RP4-13.1 (1) und RP4-13.1:Ap^S(2)

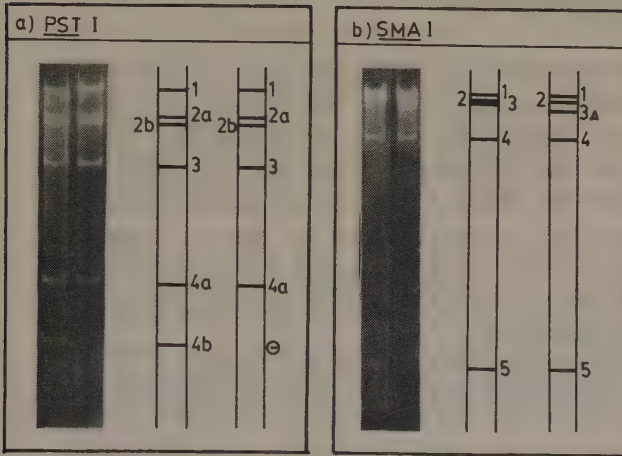


Abb.41a: Verdauung mit PstI;

1% Agarose, 120mA, 80V, 2.75 Std.

Abb.41b: Spaltung mit SmaI;

1% Agarose, 150mA, 120V, 2 Std.

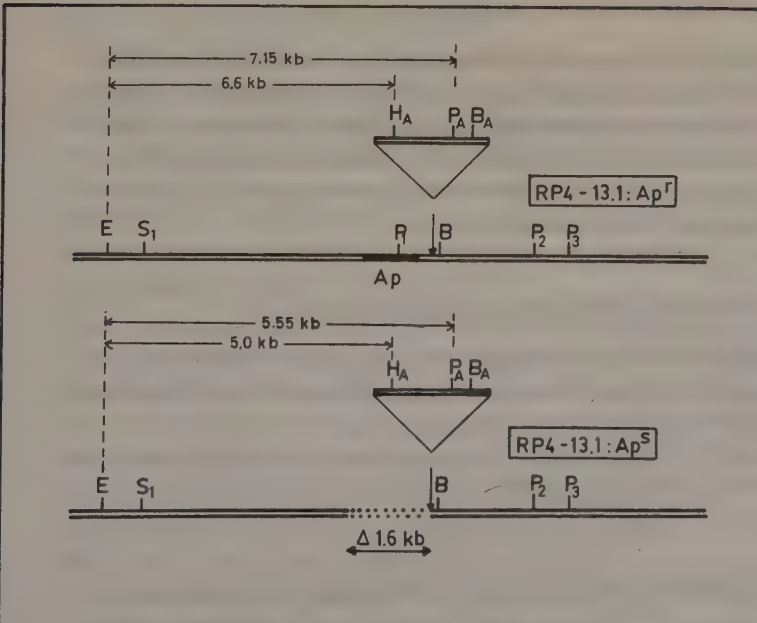


Abb.42: Verlust der Ap^R in der Mutante RP4-13.1:Ap^S.

Am HindIII-Ende der ISR1_A-Insertion in RP4-13.1 beginnt eine Deletion von ca. 1.6 kb, die die im bla-Gen gelegene PstI-Stelle P₁ umfaßt.

D.V : VERÄNDERUNGEN VON TRANSPOSON-EIGENSCHAFTEN DURCH DIE INSERTION VON ISR1 IN Tn1

Die Analyse der RP4-Mutanten aus *R. lupini* ergab, daß das Insertionselement ISR1 bevorzugt in das Tn1-Transposon des RP4-Plasmids integriert. Dabei erfolgt die Insertion sehr spezifisch in Bezug auf die Orientierung von ISR1 und sehr wahrscheinlich auch auf die Integrationsstelle (vergl. E.I.1.1). Ohne Ausnahme gilt, daß ein Verlust der Ap^r nur im Zusammenhang mit Deletionen auftritt; bisher wurde kein Plasmid isoliert, bei dem die Ap -Sensitivität direkt auf die ISR1-Insertion zurückzuführen wäre.

ISR1 inseriert also immer außerhalb der Ap^r -Genregion und hat damit keinen Einfluß auf die Expression der Tn1-codierten β -Lactamase.

Damit stellt sich die Frage, ob und auf welcher Ebene sich die ISR1-Insertion in Bezug auf andere Tn1-Funktionen und -Eigenschaften bemerkbar macht.

Die folgenden Untersuchungen wurden mit Tn1-Elementen der RP4-3 - Plasmide durchgeführt. Da diese Tn1::ISR1-Transposons keine Deletionen aufweisen, kann man davon ausgehen, daß keine Tn1-spezifische genetische Information verloren ist. Der einzige Unterschied zum Wildtyp-Transposon liegt in der Insertion von ISR1.

V.1 : TRANSPOSITIONSVERHALTEN VON Tn1::ISR1

Die Fähigkeit, von einem Replikon auf andere Replikons zu translocieren, ist neben der Ampicillin-Resistenz das charakteristischste Merkmal von Tn1.

Die folgenden Experimente sollen zeigen, ob ISR1 diese transposonspezifische Eigenschaft in irgendeiner Weise beeinflusst.

V.1.1 : Nachweis der Transpositionsfähigkeit von Tn1::ISR1

In Vorversuchen wurde zuerst getestet, ob Tn1::ISR1 grundsätzlich noch zur Transposition fähig ist.

Als Donorplasmide dienten die Km^S RP4-Mutanten RP4-3.1 und RP4-3.2. Als drittes Plasmid wurde die von Spitzbarth (1978) charakterisierte Km^S Mutante in die Untersuchungen mit einbezogen, die in der vorliegenden Arbeit mit RP4-3.0 bezeichnet wird. Sie unterscheidet sich in der Tn1-Region nicht von den Molekülstrukturen der anderen RP4-3-Plasmide (vergl. Abb.12 und Abb.13), trägt also eine ISR1-Insertion unmittelbar neben dem BamHI-Schnitt, weist aber keine Deletionen im Tn1-Bereich auf.

Pühler und Krauss (1977) zeigten, daß das unveränderte Tn1-Transposon mit großer Häufigkeit auf das Genom des Phagen P1Cmts und auf das Fertilitätsplasmid von E.coli (F-Plasmid) wechseln kann. Daher wurden diese Replikons für die ersten Transpositionsstudien als Rezipientengenome gewählt. Da die Transposition unabhängig vom zellulären Rekombinationssystem abläuft, wurden die unten beschriebenen Versuche in einem Rec^- -Stamm, CSH 52, durchgeführt.

V.1.1.1: Transposition auf P1Cmts

Der allgemein transducierende Phage P1Cmts besitzt einen temperatursensitiven $c1$ -Repressor (ts) (Rosner, 1972), der es ermöglicht, einen P1-lysogenen Stamm durch einfache Temperaturerhöhung von $30^{\circ}C$ auf $42^{\circ}C$ zu induzieren.

Zudem sind P1Cmts-tragende Zellen leicht an der Chloramphenicolresistenz (Cm) (Kondo und Mitsuhashi, 1964) zu erkennen, die durch das Transposon Tn9 (Gottesman und Rosner, 1975) hervorgerufen wird.

Eine Transposition von Tn1::ISR1 auf das P1Cmts-Genom läßt sich sehr leicht nachweisen. Das Donorplasmid (in diesem Fall eine der RP4-3-Mutanten) wird in einer P1Cmts-lysogenen Zelle bei $30^{\circ}C$ vermehrt. Durch Temperaturerhöhung auf $42^{\circ}C$ wird die lytische Vermehrung des P1-Phagen induziert.

Fand in der lysogenen Zelle eine Transposition von Tn1::ISR1 vom RP4-3-Molekül auf das P1-Genom statt, enthält das freigesetzte Phagenlysate folgende P1-Partikel:

- normale P1Cmts-Phagen : Markierung Cm^R
- RP4-3-transduzierende : : Markierung Ap^R , Tc^R
Phagen

- P1Cmts-Phagen mit Tn1::ISR1 : Markierung Ap^r , Cm^r
= (P1Cmts)::(Tn1::ISR1)

Nach Lysogenisierung eines geeigneten E.coli-Rezipienten lassen sich diese Phagenpartikel an Hand ihrer Resistenzmarkierungen unterscheiden.

Das Verhältnis der Anzahl Ap^r , Cm^r Rezipienten zur Gesamtzahl der P1Cmts-lysogenen Zellen ergibt die Rate, mit der Tn1::ISR1 auf das Genom von P1Cmts translocierte.

Die Durchführung solcher Versuche ergab, daß etwa 1,2 - 7,5 von 100 Zellen bei der Lysogenisierung sowohl die Ap -Resistenz des RP4-3-Plasmids, als auch die Cm -Resistenz des P1-Phagen erworben hatten.

Das bedeutet, daß die Rate der Transposition von Tn1::ISR1 auf P1Cmts in der Größenordnung von 10^{-2} liegt.

Um sicher zu stellen, daß es sich bei den Ap^r , Cm^r -Kolonien tatsächlich um (P1Cmts)::(Tn1::ISR1)-tragende Bakterien handelt, wurden aus diesen Zellen abermals durch Hitzeinduktion die Phagenpartikel freigesetzt um damit eine erneute Lysogenisierung durchzuführen.

Dabei zeigte sich, daß die Marker Ap^r und Cm^r zu 100% gekoppelt, also vom gleichen Phagenpartikel übertragen wurden.

V.1.1.2: Transposition von Tn1::ISR1 auf F'(lac,pro)

In einem zweiten Vorversuch wurde die Translocation auf das Fertilitätsplasmid F von E.coli versucht, ebenfalls in einem Rec^- -Wirt.

Zur leichteren Erkennung des F-Replikons wurde das Derivat F'(lac,pro) verwendet, das in Lac^- oder Pro^- -Rezipienten leicht zu identifizieren ist.

Die RP4-3-Mutanten wurden zusammen mit dem F'-Plasmid im rekombinationsdefekten Stamm CSH 52 vermehrt.

Der Nachweis der Transposition von Tn1::ISR1 auf das F'-Genom erfolgte durch Konjugation mit dem Stamm CSH 56: Lac^- , Pro^- als Rezipienten.

Die meisten der Rezipienten erwarben bei diesem Versuch nur das F'-Plasmid (Markierung: Lac^+ , Pro^+); unter den Ap^r Trans-

konjuganten besaß der größere Teil beide Plasmide (Markierung: Lac^+ , Pro^+ , Ap^r , Tc^r), ein kleinerer Teil trug jedoch ein $\text{F}'(\text{lac,pro})::(\text{Tn1}::\text{ISR1})$ -Molekül (Markierung: Lac^+ , Pro^+ , Ap^r). Die Frequenz mit der diese $\text{F}'::(\text{Tn1}::\text{ISR1})$ -Plasmide übertragen wurden, lag bei 10^{-5} , bezogen auf den $\text{F}'(\text{lac,pro})$ -Transfer.

V.1.2 : Transposition von $\text{Tn1}::\text{ISR1}$ auf "multicopy" Plasmide

Nachdem in den oben beschriebenen Vorversuchen sichergestellt wurde, daß das Element $\text{Tn1}::\text{ISR1}$ nach wie vor von einem Replikon auf das andere wechseln kann, wurde diese Fähigkeit genutzt, $\text{Tn1}::\text{ISR1}$ -tragende Plasmide zu konstruieren, die genetisch und molekularbiologisch leichter zu handhaben sind als die sehr großen Derivate des P1-Phagen (58.6×10^6 d für P1; Bächli und Arber, 1977) und des F-Plasmids ($30.8 - 31.7 \mu\text{m}$; Clowes, 1972).

Da für die Untersuchungen, in denen diese Plasmide Verwendung finden sollten, eine hohe Kopienzahl von Vorteil ist, wurden als Akzeptor-Replikons kleine "multicopy" Plasmide verwendet.

V.1.2.1: Isolierung von $\text{ColE1}::(\text{Tn1}::\text{ISR1})$

Das Plasmid ColE1 codiert für die Produktion des Bacteriocins Colicin E1 (Col) und verleiht seiner Wirtszelle gleichzeitig Immunität gegen dieses Antibiotikum (Col^{imm}) (Nomura, 1967; Bazaral und Helinski, 1972). Es hat eine Länge von $2.31 \mu\text{m}$ (Inselburg und Fuke, 1970) und liegt normalerweise in mehreren Kopien (7-12) pro Chromosom vor. Nach Chloramphenicol-Behandlung können bis zu 3000 Kopien pro Zelle nachgewiesen werden (Bazaral und Helinski, 1970; Clewell, 1972).

Als Donorplasmid für $\text{Tn1}::\text{ISR1}$ wurde die RP4-Mutante RP4-3.2 verwendet, die durch Transduktion mit dem Phagen P1kc auf den Stamm CR34 (= *E.coli* K12:ColE1) übertragen wurde. Dieser Stamm wurde mit CSH 56:Nx^r gekreuzt und auf Ap^r Rezipienten selektioniert. ColE1 ist nicht selbsttransmissibel, kann aber von konjugativen Plasmiden wie RP4 mobilisiert werden.

Kolonien mit den Markern Ap^r (= $Tn1::ISR1^+$), Tc^s (= $RP4-3^-$), Col^{imm} (= $ColE1^+$) wurden isoliert und nach SDS-Lyse im Agarosegel untersucht.

Anstelle von $ColE1$ trat in den isolierten Kolonien eine neue Plasmidbande auf, deren Länge dem aus $ColE1$ (6.3 kb) und $Tn1::ISR1$ (etwa 6 kb) zusammengesetzten Plasmid $ColE1::(Tn1::ISR1)$ entsprach.

Aus einem dieser Stämme wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse die Integration von $Tn1::ISR1$ in $ColE1$ abgesichert. Die Verdauung mit PstI ist in Abb.43 (Seite 116) gezeigt. Im Gegensatz zu $ColE1$, das zwei Schnittstellen für PstI besitzt (Armstrong und Helinski, 1977) (Abb.43, Spur 1), wird $ColE1::(Tn1::ISR1)$ sechsmal von PstI geschnitten (Spur 2). Daß die zusätzlichen Erkennungsstellen durch $Tn1::ISR1$ eingeführt sind, beweist der Vergleich mit dem Spaltmuster von $RP4-3.2$: in $ColE1::(Tn1::ISR1)$ treten neben der kleinen $ColE1$ -Bande (B) alle $Tn1::ISR1$ -typischen PstI-Fragmente (P4a, P4b, P6) auf. An der Spaltung des Fragments A in A_1 und A_2 wird gleichzeitig erkennbar, daß $Tn1::ISR1$ in das große PstI-Fragment des $ColE1$ -Plasmids integriert ist.

V.1.2.2: Isolierung von pWK25.2-Derivaten

Plasmid pWK25.2 (Tc^r) ist ein Abkömmling des Vektorplasmids pACYC 184, das Resistenz gegen Tc und Cm verleiht (Chang und Cohen, 1978). In das Cm^r -Gen wurde durch EcoRI ein 5500 bp langes Fragment, das einen Teil der nif -Genregion aus *Klebsiella pneumoniae* trägt, cloniert. Durch diese Insertion wird das Plasmid von 4.3 kb auf 9.85 kb verlängert (Klipp, 1980).

Dieses Hybridplasmid wurde für das unten beschriebene Transpositionsexperiment als Rezipientengenom gewählt, nachdem Versuche, $Tn1$ -Insertionen in pACYC 184 zu isolieren, ohne Erfolg blieben.

a) Transposition von $Tn1$ und $Tn1::ISR1$ auf pWK25.2

Insertionen in pWK25.2 wurden isoliert nach Transformation der extrachromosomalen DNA aus den Stämmen

CSH 50: $F'(\text{lac}, \text{pro})::Tn1$; pWK25.2 und
CSH 51: $(P1Cmts)::(Tn1::ISR1)$; pWK25.2.

Die für die DNA-Isolierung verwendete "cleared lysate" Methode (vergl. C.IV.2.1) setzt vorwiegend kleine "multicopy" Plasmide frei; darüber hinaus ist eine Transformation von F':::Tn1 bzw. (P1Cmts)::(Tn1::ISR1) wegen der Größe dieser Genome unwahrscheinlich. Durch Ausspateln des Transformationsgemisches auf Ap-haltigem Medium werden daher vorwiegend pWK25.2::Tn1- bzw. pWK25.2::(Tn1::ISR1)-tragende Transformanten selektioniert.

Zur Anreicherung der Ap^r Rezipienten wurde das Transformationsgemisch nach dem Hitzeschock (vergl. C.III.2.2) in 30 ml LB+Ap (200 µg/ml) gegeben und 2 x 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die fast klare Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert, gewaschen und dann erst auf PA+Ap-Platten ausgespatelt.

Durch Überstempeln der Ap^r Transformanten auf Tc-Medium wurde auf den gleichzeitigen Erwerb von pWK25.2 getestet.

Das Vorhandensein von Plasmiden entsprechender Länge in den isolierten Kolonien wurde durch Agarosegelelektrophorese der SDS-Lysate abgesichert. Abb.44 zeigt für beide Klassen eine deutliche Plasmidverlängerung im Vergleich zu pWK25.2. Die Größe des Plasmids pWK25.21 (= pWK25.2::Tn1) entspricht der zu fordernden Zunahme durch Tn1-Insertion (1.5 x pWK25.2). Auffallend aber ist die Länge von pWK25.22 (= pWK25.2::(Tn1::ISR1)). Wegen der zusätzlichen ISR1-Insertion müßte dieses Plasmid um 1.15 kb länger sein als pWK25.21. Im abgebildeten Gel bandiert pWK25.22 jedoch unterhalb von pWK25.21, was eine Deletion in diesem Molekül vermuten läßt.

b) Fragmentanalyse von pWK25.21 und pWK25.22

Durch Restriktionsspaltungen der beiden Plasmide sollte zum einen die Translocation nachgewiesen werden, zum anderen die vermutete Deletion in pWK25.22 näher beleuchtet werden.

Das Auftreten der RP4-spezifischen Banden P4 und P6 in Plasmid pWK25.21 bzw. der für RP4-3.2 charakteristischen Fragmente P4a, P4b und P6 in pWK25.22 bewiesen das Vorliegen von Tn1 bzw. Tn1::ISR1 in diesen Hybridplasmiden.

Aus Verdauungen mit EcoRI, das das Plasmid pWK25.2 in seine Ausgangsfragmente (pACYC 184 und Klebsiella-nif) zerlegt, er-

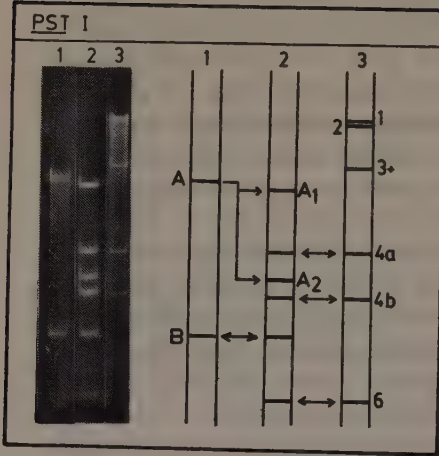


Abb. 43: Nachweis der Transposition von Tn1::ISR1 auf ColE1 durch Restriktions-spaltung mit PstI.

(1) ColE1

(2) ColE1::(Tn1::ISR1)

(3) RP4-3.2

1% Agarose, 80V, 100mA,
2.5 Std.

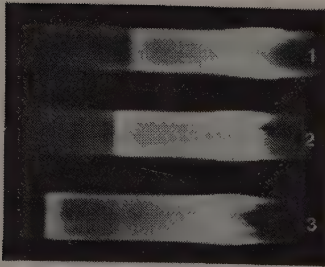


Abb. 44: Agarosegelelektrophorese von (1) E.coli(pWK25.21)

(2) E.coli(pWK25.22)

(3) E.coli(pWK25.2)

nach SDS-Lyse.

Tris-Acetat, 1% Agarose, 125 mA,
2.5 Std.

Die Plasmidbande in Spalte (1) entspricht der für pWK25.21 (pWK25.2::Tn1) zu erwartenden Länge (9.85 kb + 4.8 kb = 14.65 kb), während die Größe des Plasmids pWK25.22 (pWK25.2::(Tn1::ISR1) in Spalte (2) deutlich unter dem theoretischen Wert (9.85 kb + 4.8 kb + 1.15 kb = 15.8 kb) liegt.

gab sich für beide Plasmide die Insertion des Transposons in die *nif*-Region. Auch hier war das entsprechende Fragment in pWK25.22 wieder kürzer als in pWK25.21. Nachdem jedoch alle für Tn1::ISR1 charakteristischen PstI-Banden nachzuweisen sind, muß die Deletion die *nif*-DNA betreffen und hat keinen Einfluß auf die genetische Information des Transposons.

V.1.3 : Bestimmung der Transpositionsfrequenz

Das normale Tn1-Transposon translociert mit einer durchschnittlichen Rate von 10^{-4} (Kretschmer und Cohen, 1977).

Die bisherigen Versuche zeigen, daß ISR1 in keiner Weise die Transpositionsfähigkeit von Tn1 behindert, vermitteln aber keine Information darüber, mit welcher Häufigkeit diese Translocation von Tn1::ISR1 stattfindet.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente sind so konstruiert, daß sie Aussagen darüber zulassen, ob die Insertion von ISR1 Einfluß auf die Transpositionsfrequenz von Tn1 besitzt.

Als Donorplasmide in dieser Untersuchung wurden die in V.1.2.2 konstruierten pWK25.2-Derivate verwendet. Zur Aufnahme der Transposons diente das Plasmid pFS2o2, das durch Insertion des Tc-Transposons Tn1771 in das kryptische Plasmid pFS 2 konstruiert wurde (Schöffl und Pühler, 1979a, b).

Es überträgt sich selbst mit einer sehr hohen Rate (Schöffl und Pühler, 1979b), kann aber pWK25.2 nicht mobilisieren, wie entsprechende Vorversuche zeigten.

Donor- und Rezipientenplasmide wurden zusammen in CSH 51: Sm^r vermehrt. Durch Konjugation mit CSH 56: Nx^r konnten die aufgetretenen Transpositionseignisse sichtbar gemacht werden. Dazu wurden beide Elternstämme bei 30°C angezogen, über Nacht auf Nitrocellulose-Filtern gekreuzt und der Titer Ap^r und Tc^r Transkonjuganten bestimmt. Ausspateln des Konjugationsgemischs auf SmTc-Medium ergab den Titer plasmidtragender Donorzellen (vergl. Tab.9, Teil a).

Keine der nachgetesteten Tc^r Kolonien zeigte Resistenz gegen Ampicillin, während die primär auf NxAp selektionierten Rezipientenzellen sich beim Überstempeln als 100%ig Tc-resistent erwiesen.

DONOR	Titer der Exkonjuganten bei Selektion auf	Nachtest der Transkonjuganten auf		Verhältnis Ap^r/Tc^r	Tnp-RATE	
		Ap	Tc			
CSH 51 (pFS2o2; pWK25.21)	NxAp: 1.4×10^5	100/100	100/100	0.3×10^{-3}	1	(a) REC ⁺
	NxTc: 4.8×10^8	0/50	50/50			
	SmTc: 1.1×10^9					
CSH 51 (pFS2o2; pWK25.22)	NxAp: 2.5×10^6	100/100	100/100	4.1×10^{-3}	14	(b) REC ⁻
	NxTc: 6.0×10^8	0/50	50/50			
	SmTc: 1.3×10^9					
CSH 52 (pFS2o2; pWK25.21)	NxAp: 5.2×10^4	100/100	100/100	0.2×10^{-4}	1	(b) REC ⁻
	NxTc: 9.7×10^8	0/50	50/50			
	SmTc: 9.8×10^8					
CSH 52 (pFS2o2; pWK25.22)	NxAp: 3.2×10^5	100/100	100/100	4.5×10^{-4}	22	(b) REC ⁻
	NxTc: 6.2×10^8	0/50	50/50			
	SmTc: 7.1×10^8					

Tab.9: Vergleich der Transpositionsrate (Tnp-Rate) von Tn1 (pWK25.21) und Tn1::ISR1 (pWK25.22) auf Plasmid pFS2o2 im Rec⁺- (a) und Rec⁻-Stamm (b)

Der Titer Ap^r Transkonjuganten steht demnach für die Anzahl der Rezipienten, die beide Marker, Ap (von pWK25.21 bzw. pWK25.22) und Tc (von pFS2o2) gekoppelt erworben haben. Der Quotient Ap^r/Tc^r bezeichnet den Anteil der doppeltmarkierten Kolonien (Übertragung von pFS2o2::Tn1 bzw. pFS2o2::(Tn1::ISR1)) am Gesamtiter der Tc^r Transkonjuganten (Übertragung von pFS2o2), ist also ein Maß für die Transpositionsfrequenz.

Der Wert, der sich für die Translocation von Tn1 ergibt, wurde gleich 1 gesetzt. Für Tn1::ISR1 ergibt sich daraus eine um Faktor 14 höhere Translocationshäufigkeit.

Um eine Mobilisierung von pWK25.21 bzw. pWK25.22 mit Sicherheit auszuschließen, wurden die Längen der Plasmide in den Ap^r , Tc^r Kolonien bestimmt. Die Plasmide bandierten in der Agarosegelelektrophorese der entsprechenden SDS-Lysate etwas oberhalb von pFS2o2, während die kleinen pWK25.2-Derivate vor der chromosomalen Bande wanderten. Dadurch war bewiesen,

daß die Ap^r , Tc^r Kolonien tatsächlich Transpositionsprodukte von pFS2o2 beherbergen.

Dieser Transpositionsversuch wurde analog auch im rekombinationsdefekten Stamm CSH 52 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Teil b der Tabelle 9 zusammengestellt.

Hier ergibt sich für $Tn1::ISR1$ eine 22fach höhere Transpositionsrate als für das Wildtyp-Transposon.

Bei diesem Experiment wurde auf die Überprüfung der Plasmidlängen im Agarosegel verzichtet.

V.2 : VERÄNDERUNGEN IM PROTEINMUSTER VON $Tn1::ISR1$

Vorbemerkung:

Nachdem gezeigt wurde, daß $ISR1$ weder die Ap -Resistenz noch die Transpositionsfähigkeit inaktiviert, beschäftigt sich dieses Kapitel mit der Frage, ob sich die Insertion von $ISR1$ in $Tn1$ auf Proteinebene bemerkbar macht.

Dies sollte durch Gegenüberstellung der Proteinmuster von $Tn1$ und $Tn1::ISR1$ geklärt werden. Gleichzeitig sollte dieser Vergleich Aufschluß darüber geben, ob $ISR1$ eventuell selbst für ein oder mehrere Polypeptide codiert.

Die Codierkapazität von $ISR1$ reicht bei 115o bp theoretisch aus, ein Protein vom Molekulargewicht 44.000 zu determinieren, wenn pro Aminosäure (AS) ein durchschnittliches MW von 115 angenommen wird.

Die Methode, die sich für die Analyse von Genprodukten anbietet, ist die Verwendung von *E.coli*-Minizellen. Der für diese Untersuchung gewählte Stamm DS41o besitzt auf Grund seiner Mutationen $minA$ und $minB$ die Eigenschaft, bei der Zellteilung Tochterzellen zu segregieren, die frei vom chromosomalen DNA sind. Da diese Zellen wesentlich kleiner sind, können sie in einem Sucrosegradienten von den normalen Elternzellen der Kultur abgetrennt werden. Die einzelnen Schritte dieses Vorgangs sind in C.VIII beschrieben.

Je nach Alter der Kultur kann man in plasmidfreien Minizellen eine "Restsynthese" von bestimmten Polypeptiden nachweisen, im wesentlichen Proteine mit den Molekulargewichten 37.000, 34.000 und 22.000. Wahrscheinlich werden chromosomal

codierte, stabile mRNA-Moleküle während der Zellteilung in die Minizellen segregiert, die dort translatiert werden (Levy, 1975). Bei der Isolierung der Minizellen aus stationären Kulturen ist die Synthese dieser Proteine jedoch so gering, daß sie im Polyacrylamid-Gel kaum als Bande sichtbar werden (Dougan et al., 1979).

Ein Plasmid, das im Minizellstamm vorliegt, wird im Gegensatz zum Chromosom während der Anzucht gleichmäßig auf die Tochterzellen weitervererbt. Die aus der Bakterienkultur isolierte Minizellfraktion produziert demnach fast ausschließlich plasmidcodierte Proteine.

V.2.1 : Das Trägerplasmid pWK25.2

Für die Identifizierung der zu untersuchenden Proteine ist es von Vorteil, wenn deren Information auf Plasmiden vorliegt, die selbst möglichst wenig, genau charakterisierte Genprodukte synthetisieren. Gleichzeitig ist es von Wichtigkeit, daß die erwünschten Polypeptide in ausreichender Menge produziert werden, d.h. vorzugsweise auf "multicopy" Plasmiden determiniert sind.

Zur Darstellung von Tn1- und Tn1::ISR1-codierten Proteinen ist daher das Plasmid RP4 sehr ungeeignet.

Deswegen wurde als Trägerplasmid für die zu untersuchenden Transposons das bereits in V.1.2.2 vorgestellte Hybridplasmid pWK25.2 gewählt, das alle genannten Voraussetzungen erfüllt. Es soll hier im Hinblick auf die Proteinanalyse noch einmal genauer beschrieben werden (Abb.45).

Es ist zusammengesetzt aus dem "multicopy" Plasmid pACYC 184 (Tc, Cm) (Chang und Cohen, 1978) und einem 5500 bp großen EcoRI-Fragment der nif-Region aus *Klebsiella pneumoniae*, das in die Cm-Resistenzdeterminante inseriert ist (Klipp, 1980).

Das clonierte nif-Fragment verfügt über keine eigene Transkription und ist gegenläufig zur Transkriptionsrichtung des Cm-Gens inseriert. Daher kommt es lediglich zur Synthese eines sogenannten "Fusionsproteins" vom MW 13.000, ein Klonierungsartefakt, dessen Entstehung der Legende zu Abb.45 entnommen werden kann.

Die Genprodukte der Tc-Resistenzdeterminante treten kaum in Erscheinung, da sie nur in sehr geringen Mengen synthetisiert werden und zudem der Membranfraktion angehören.

Damit ist das Fusionsprotein das einzige prominente Genprodukt im Polypeptidmuster von pWK25.2 (vergl. Abb.46, Spur a).

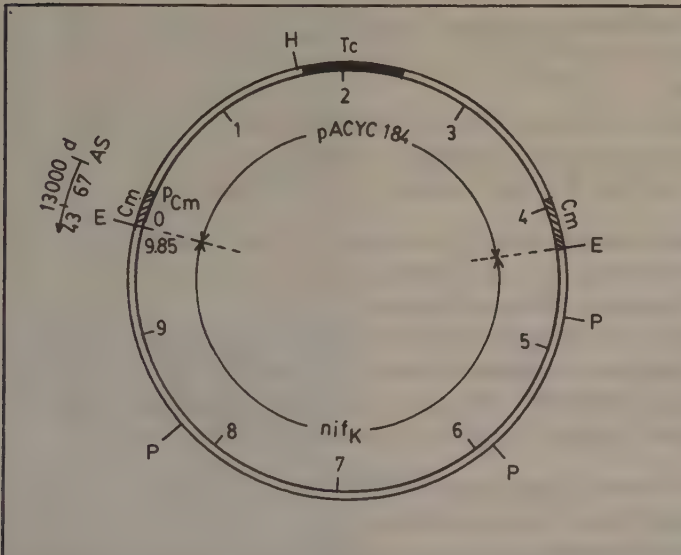


Abb.45: Karte des Plasmids pWK25.2 mit den Restriktionsstellen für EcoRI(E), PstI(P) und HindIII(H).

In den EcoRI-Schnitt von pACYC 184 (Chang und Cohen, 1978) ist ein 5500 bp großes Fragment der *nif*-Region aus *Klebsiella pneumoniae* cloniert (*nif_K*) (Klipp, 1980). Dadurch wird das Gen für Chloramphenicol-Resistenz (*Cm*) in zwei Teile von 200 bp und 350 bp zerlegt. Die Transkription, die vom Promoter *pCm* aus startet, läuft über den Eco-Schnitt und liest in die *nif*-DNA hinein. Da die *nif*-Region gegenläufig zur Transkriptionsrichtung des *Cm*-Gens inseriert ist, kommt es bei der Translation relativ bald (nach 130 bp = 43AS) zum Abbruch der AS-Kette. Insgesamt entsteht ein Protein mit 13.000 d ("Fusionsprotein"), das sich aus dem N-terminalen Ende der Chloramphenicolacetyltransferase (67 AS = 8.000 d) und dem Translationsprodukt des Unsinnstranges der *nif*-DNA (43 AS=5.000d) zusammensetzt.

V.2.2 : Das Proteinmuster von Tn1::ISR1

Die Konstruktion von Tn1- und Tn1::ISR1-tragenden pWK25.2-Derivaten ist in V.1.2.2 beschrieben.

Die Proteinmuster beider Plasmide, pWK25.21 (mit Tn1) und pWK25.22 (mit Tn1::ISR1) sollen einander gegenübergestellt werden.

Zur Kontrolle wurden auch die Proteine des ColE1-Derivats ColE1::(Tn1::ISR1) bestimmt; die Konstruktion dieses Plasmids ist dem Kapitel V.1.2.1 zu entnehmen.

Plasmidtragende E.coli DS410-Minizellen wurden nach selektiver Anzucht bis zur Stationärphase nach der in C.VIII.1 beschriebenen Methode isoliert.

Die neu synthetisierten Polypeptide wurden durch Zugabe von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert und in einem 14-20%igen Polyacrylamid(PAA)-Gel nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Abb.46 zeigt die erhaltenen Proteinmuster.

Als interner Größenmarker diente das Fusionsprotein von pWK25.2 (MW = 13.000) (Abb.46, Spur 1) und das Colicin E1, dessen Molekulargewicht mit 56.000 angegeben wird (Schwartz und Helinski, 1971) (Abb.46, Spur 6).

Die für die Ampicillin-Hydrolyse verantwortlichen Proteine wurden durch Vergleich mit pBR322 (Bolivar et al., 1977a,b) identifiziert. pBR322 besitzt das Ap-Resistenzgen des Transposons Tn3, dessen bla-Genprodukte identisch sind mit denen von Tn1 (Dougan et al., 1979). Wie in allen Tn1/Tn3-tragenden Plasmiden treten in pBR322 drei charakteristische Proteine auf, die verschiedenen Formen der β -Lactamase zugeordnet werden.

Das größte Polypeptid stellt eine Vorstufe (precursor) dar, die dann in die aktive Form der β -Lactamase umgewandelt wird. Das dritte Protein wird als Abbauprodukt angesehen. (Dougan und Sherratt, 1977); Inselburg und Applebaum, 1978; Dougan et al., 1979).

Zusätzlich zu diesen drei bla-Proteinen tritt im Gel der Abb.46 eine vierte Peptidbande auf, die möglicherweise ebenfalls ein Abbauprodukt der β -Lactamase darstellt.

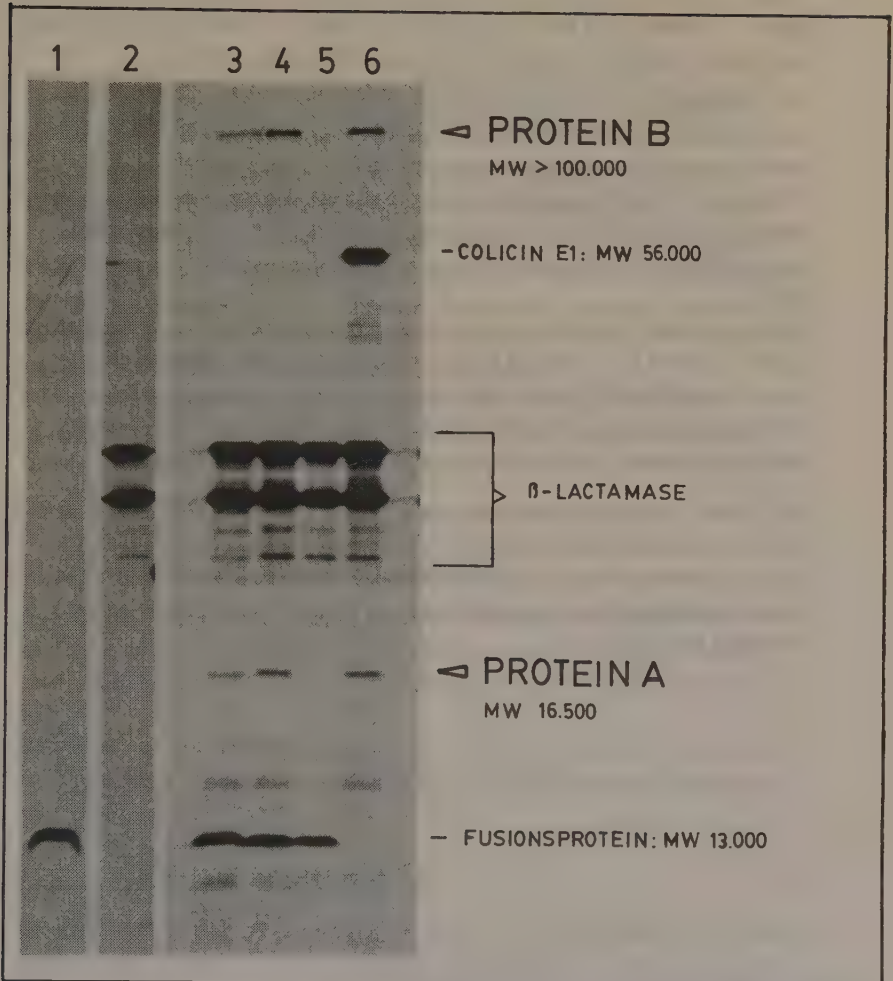


Abb.46: Vergleich der Proteinmuster Tn1::ISR1- und Tn1-tragender Plasmide, synthetisiert in Minizellen von E.coli DS410. (14-20% Polyacrylamidgel, 150V, 15 Std.).

Die Proteinfraktionen folgender Plasmide wurden aufgetragen:

- | | | |
|-------------|--------------------------|------------------------|
| (1) pWK25.2 | (3) pWK25.2::(Tn1::ISR1) | (5) pWK25.2::Tn1 |
| (2) pBR322 | (4) pWK25.2::(Tn1::ISR1) | (6) ColE1::(Tn1::ISR1) |

Diese vier Proteine sind ohne erkennbare Unterschiede sowohl in pWK25.2::Tn1 (Spur 5) als auch in den Tn1::ISR1-tragenden Plasmiden (Spalte 3, 4 und 6) nachzuweisen.

Die Spalten 3 und 4 zeigen die Proteinmuster von zwei verschiedenen Tn1::ISR1-Derivaten des Plasmids pWK24.2.

Der Vergleich mit dem Polypeptidmuster von pWK25.2::Tn1 (Spalte 5) läßt deutlich zwei zusätzliche Proteinbanden erkennen, denen Molekulargewichte von ca. 16.500 (Peptid A) und größer als 100.000 (Polypeptid B) zugeordnet werden können.

Die gleichen Banden A und B treten auch im Plasmid ColE1::Tn1::ISR1 (Spalte 6) auf. Leider fehlt hier der Vergleich mit dem Proteinmuster von ColE1::Tn1; in der Literatur sind jedoch keine entsprechenden Proteine beschrieben (Inselburg und Applebaum, 1978; Dougan und Sherratt, 1977).

Da diese Polypeptidbanden unabhängig vom Trägerplasmid auftreten und nur von Tn1::ISR1-tragenden Plasmiden synthetisiert werden, ist ein Zusammenhang zwischen ISR1 und diesen zwei Proteinen zu fordern, der in Teil E.II dieser Arbeit diskutiert wird.

E : D I S K U S S I O N

E.I : RP4::ISR1-MUTANTEN: ALLGEMEINE BETRACHTUNG DER ISR1- INSERTIONEN UND RÜCKSCHLÜSSE AUF DAS RP4-MOLEKÜL

Die Analyse von insgesamt 16 RP4-Mutanten aus *Rhizobium lupini* ergab, daß alle Mutationen mit Insertionen in Verbindung gebracht werden können. Daß es sich bei den inserierten Sequenzen immer um das gleiche Element ISR1 handelt, ist im Laufe der Untersuchungen mehrfach gezeigt worden, so daß über die Identität der DNA-Insertionen in den RP4-Mutanten nicht mehr diskutiert werden muß.

In diesem Kapitel sollen vielmehr die Strukturen der RP4::ISR1-Mutanten im Zusammenhang betrachtet und geprüft werden, welche Rückschlüsse daraus in Bezug auf das RP4-Molekül möglich sind.

I.1 : ISR1-INSERTIONEN IM RP4-PLASMID

Das Element ISR1 ist in allen untersuchten RP4-Mutanten mindestens einmal integriert. In den meisten Molekülen sind zwei, in einem Fall sogar drei Kopien von ISR1 nachgewiesen.

Dabei sind die ISR1-Insertionen nicht willkürlich verteilt, sondern es können drei definierte Integrationsregionen auf dem RP4-Plasmid lokalisiert werden.

I.1.1: Die Integrationsbereiche

In Kapitel D.II.2.5 wurden die drei verschiedenen RP4-Regionen, in die das ISR1-Element inseriert, bereits schematisch dargestellt (Abb. 24). Sie sollen im folgenden eingehender analysiert werden.

a) Insertionen in In1: ISR1_A

Der Vergleich der ISR1_A-Insertionen in den analysierten Plasmidmutanten führt zu folgenden generellen Aussagen:

1. Transposon Tn1 stellt die für ISR1-Integration bevorzugte RP4-Region dar, da alle untersuchten Mutan-

- ten, ob Ap^R oder Ap^S , eine Insertion in diesem Bereich tragen (vergl. Tabelle 1a);
2. Die Integration von $ISR1$ in $Tn1$ erfolgt sehr spezifisch hinsichtlich der Orientierung der Insertion (vergl. Tab. 1a);
 3. Innerhalb von $Tn1$ existiert eine definierte Integrationsstelle für $ISR1$, die dicht neben der $BamHI$ -stelle B lokalisiert ist und außerhalb des Ap^R -Gens (bla -Gen) liegt (etwa 50-100 bp links von B).

Diese drei Punkte sollen etwas eingehender besprochen werden.

zu 1: Diese Tatsache ist insofern bemerkenswert, als nicht alle translocierbaren Elemente (zu denen $ISR1$ gerechnet werden kann) in das Transposon $Tn1$ inserieren können. Dies geht z.B. aus Arbeiten von Barth und Mitarbeitern hervor, die das $RP4$ -Plasmid mit Hilfe von TnC (= $Tn7$) - Insertionen kartierten (Barth und Grinter, 1977a,b; Barth et al., 1978). Im Bereich des Ap -Transposons konnten die Autoren keine einzige $Tn7$ -Insertion finden und diskutieren die Möglichkeit, daß $Tn1$ eine essentielle $RP4$ -Funktion kontrolliert. Bei Verwendung des Transposons $Tn76$ war allerdings ohne Schwierigkeit eine Ap^S $RP4$ -Insertionsmutante zu isolieren, obwohl $Tn7$ und $Tn76$ bezüglich Resistenzeigenschaften, Molekulargewicht und Restriktionsstellen identisch sind (Barth, 1979). Der Autor erklärt dieses Ergebnis mit einem bisher noch nicht erkannten Unterschied zwischen den beiden Transposons.

zu 2: Die Beobachtung, daß $ISR1$ nur in einer bestimmten Orientierung in $Tn1$ inseriert ist, kann nicht als $ISR1$ -spezifische Eigenschaft angesehen werden (vergl. $ISR1_K$ -Insertionen). Möglicherweise ist diese Tatsache - im Zusammenhang mit Punkt 1 - als eine "limitierte Insertionsmöglichkeit" zu interpretieren: im Gegensatz zu $Tn7$ kann $ISR1$ zwar sehr leicht und sehr häufig in $Tn1$ integrieren, die Insertion ist allerdings nur in einer Richtung möglich.

PLASMID	PHÄNOTYP	TRANSPOSON Tn1		Km ^r -DETERMINANTE		TRANSFERREGION Tra 3	
		ORIEN- TIERUNG	DELETION	ORIEN- TIERUNG	DELETION	ORIEN- TIERUNG	DELETION
RP4-2.1	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ⁺	→	4.6 kb	←	∅		
RP4-2.2	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ⁺	→	0.5 kb				
RP4-2.3	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ⁺	→	0.9 kb	←	∅		
RP4-3.1	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	∅	→	0.9 kb		
RP4-3.2	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	∅	←	1.8 kb		
RP4-5.1	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	4.55kb	←	∅		
RP4-5.2	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	0.2 kb	←	1.8 kb		
RP4-5.3	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	0.85kb	←	1.8 kb		
RP4-5.4	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	6.1 kb	←	18.5 kb		
RP4-5.81	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	0.3 kb	←	1.8 kb		
RP4-5.82	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	4.65kb	→	∅	←	∅
RP4-12	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ⁺	→	∅				
RP4-13	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ⁺	→	3.65kb				
RP4-13.1	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ⁺	→	∅			←	∅
RP4-13.2	Ap ^r Km ^r Tc ^r Tra ⁺	→	1.7 kb			←	∅
RP4-13.5	Ap ^r Km ^r Shc ^r Tra ⁺	→	0.3 kb	←	1.8 kb		

Tab. 10: Überblick über die ISR1-Insertionen in den untersuchten RP4-Mutanten.
Für jede der drei Integrationsregionen ist angegeben, ob und in welcher Orientierung in dem jeweiligen Plasmid eine Insertion vorhanden ist, ob Deletionen in Nachbarschaft der Insertionen auftreten und deren Längen.

zu 3: Diese Behauptung muß durch einige Erläuterungen erhärtet werden.

Da reine ISR1-Insertionen in Tn1 (ohne Deletionen) keine Ampicillinsensitivität verursachen, muß die Integrationsstelle außerhalb des Resistenzgens liegen.

In den Fällen, in denen keine Deletionen auftreten, ist gleichzeitig leicht erkennbar, daß ISR1 immer an derselben Stelle inseriert ist: das Fragment P4 wird durch die eingeführte PstI-Stelle P_A jeweils in zwei typische Banden P4a (2,3 kb) und P4b (1.45 kb) gespalten (vergl. Abb.47a). Damit kann die Insertionsstelle innerhalb des Fragmentes P4, und zwar wenige bp links der BamHI-Stelle, festgelegt werden (Pfeil in Abb.47a).

In den Mutanten, in denen ISR1_A mit Deletionen verbunden ist, kann prinzipiell nicht entschieden werden, an welcher Position das Element integriert ist. Erst der systematische Vergleich verschiedener Deletionsmutanten macht die Lokalisierung der Insertionsstelle in unmittelbarer Nähe des BamHI-Schnittes wahrscheinlich. Dies soll an zwei Beispielen veranschaulicht werden.

Abb. 47b zeigt den entsprechenden Plasmidbereich der Ap^S Mutante RP4-5.81, die zwischen den Positionen P₁ und B eine Deletion von ca. 300 bp aufweist. Der Vergleich mit Abb.47a verdeutlicht, daß sich durch diese Deletion das Fragment P4b verkürzt, während Fragment P4a nicht verändert wird.

Die umgekehrte Situation findet sich in dem Plasmid RP4-13 (Abb.47c). In dieser Mutante ist eine Deletion von 3650 bp nachgewiesen, die die Schnittstellen P₂ und P₃ umfaßt, jedoch keinen Einfluß auf die Expression der Ampicillinresistenz nimmt. Dementsprechend fehlt in der PstI-Verdauung dieses Plasmids die Bande P4a, während die Fragmente P4b, EB_A und EH_A unverändert auftreten.

Da die nicht von Deletionen betroffenen Fragmente in ihren Längen mit denen der Abb.47a übereinstimmen, kann auch in den Deletionsmutanten die dort gekennzeichnete Position als Insertionsstelle angenommen werden.

Die Auswirkung der ISR1-Insertion an dieser Stelle wird im Zusammenhang mit den Tn1::ISR1-spezifischen Proteinen (E.II) diskutiert.

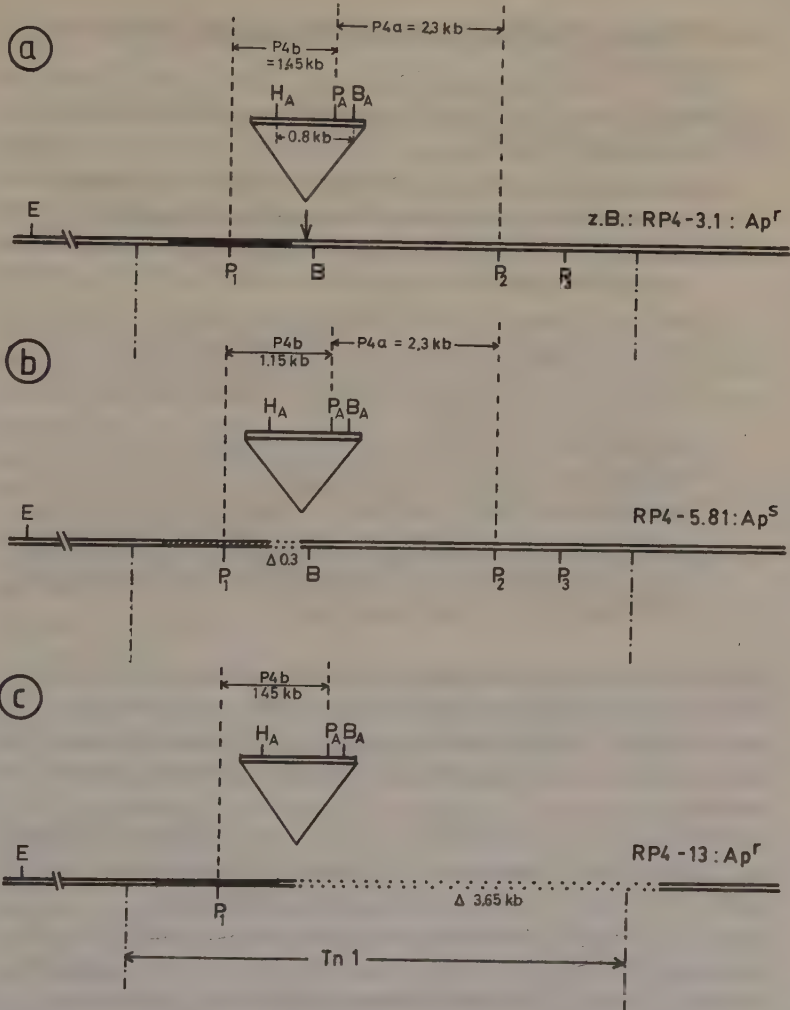


Abb.47: Insertion von ISR1 in das Ampicillin-Transposon Tn1
 (a) zeigt die Struktur, wie sie für Ap^r Mutanten, die in diesem Bereich keine Deletionen aufweisen, typisch ist. In (b) und (c) sind Beispiele dargestellt, bei denen die ISR1-Insertionen mit Deletionen verbunden sind. Eine definierte Integrationsstelle dicht neben dem BamHI-Schnitt (B), markiert durch den Pfeil in (a), kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden.

b) Insertion von ISR1 in oder in Nähe der Km^r-Deter-
minante: ISR1_K

Für diese Gruppe von Insertionen ergibt sich im Zusammen-
hang folgendes Bild:

1. Die Integration von ISR1 kann in beiden Richtun-
gen erfolgen; meist wurde die Orientierung ge-
funden, die gegenläufig zur Insertion in Tn1 ist
(vergl. Tab.10);
2. Die ISR1-Insertionen liegen in dem Bereich zwi-
schen der HindIII-Stelle H und der PstI-Stelle
P₅; eine definierte Integrationsstelle wie in Tn1
ist nicht zu erkennen;
3. Während Ap-Sensitivität nur im Zusammenhang mit
Deletionen zu beobachten ist, kann der Verlust der
Kanamycinresistenz auf zwei verschiedene Mutations-
mechanismen zurückgeführt werden: auf die Insertion
von ISR1 direkt in die Genregion oder auf Deletionen
in Nachbarschaft der Insertion.

Die Lage der Km^r-Determinante wurde von Barth und Mitar-
beitern durch Transposonmutagenese lokalisiert (Barth
und Grinter, 1977a,b; Barth et al., 1978). Der einzige
HindIII-Schnitt des RP4-Moleküls liegt innerhalb dieser
Genregion.

Insertionen in unmittelbarer Nähe dieser Restriktionsstel-
le liegen damit innerhalb der Resistenzdeterminante und
haben die Inaktivierung dieses Gens zur Folge.

Dies ist der Fall bei den Plasmiden RP4-5.1 und RP4-5.82,
in denen die ISR1_K-Elemente etwa 200 bp rechts von HindIII
inseriert sind. Die SmaI-Erkennungsstelle S₅ liegt aber
schon eindeutig außerhalb der Resistenzgenregion, da aus
der ISR1_K-Insertion in RP4-2.1, die etwa 200 bp links
von S₅ lokalisiert werden kann, kein Verlust der Km-Resi-
stenz resultiert (vergl. Abb.51).

Eine zweite Art von Mutationen ist auf Deletionen zurück-
zuführen, die im Punkt I.2 besprochen werden.

c) ISR1-Insertionen in der Transferregion Tra3: ISR1_T

Im Unterschied zu vielen anderen Plasmiden, wie z.B. dem F-Plasmid oder R-Plasmiden der IncFII-Gruppe, sind die Transfergene des RP4-Plasmids nicht "geclustert", sondern auf verschiedene Bereiche des Moleküls verteilt. Bisher sind drei solcher Tra-Regionen (wiederum durch Tn7-Transposon-mutagenese) identifiziert: Tra1, Tra2 und Tra3 (Barth und Grinter, 1977a,b; Barth et al., 1978; Barth, 1979).

In drei der vier untersuchten Tra⁻ Mutanten ist der Verlust der Transferfähigkeit auf ISR1-Insertionen ungefähr bei Position 19 des RP4-Moleküls zurückzuführen. Dieser Bereich entspricht der von Barth als Tra3 definierten Genregion. Die vierte Tra⁻ Mutante ist Plasmid RP4-5.4, dessen Transfernegativität durch eine Deletion verursacht ist und das in E.I.2 behandelt wird.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Tn7 konnten weder in der großen Tra-Region Tra1 noch in Tra2 ISR1-Insertionen nachgewiesen werden.

Die ISR1-Insertionen in Tra3 stimmen in allen drei Mutanten (RP4-13.1, RP4-13.2, RP4-5.82) in Bezug auf Integrationsstelle und Orientierung vollkommen überein. Wie in Tn1 scheint ISR1 auch in Tra3 nur an einer bestimmten Stelle und in einer bestimmten Orientierung (invers zur Insertion in Tn1) inserieren zu können.

Abb.48 zeigt die ISR1_T-Insertionen, wie sie in den Plasmiden RP4-13.1 und RP4-13.2 vorliegen.

Der durch ISR1_T eingeführte PstI-Schnitt P_T teilt das große PstI-Fragment in zwei Teile von 11.5 kb (P2a) und 10 kb (P2b). In Plasmid RP4-5.82 ist Fragment P2b auf Grund der von ISR1_A ausgehenden Deletion der Schnittstelle P₃ etwas verkürzt (vergl. Restriktionsanalyse dieses Plasmids in D.II.2.4.2). Identisch ist jedoch der Abstand zwischen den Restriktionsstellen S₃ und P_T, so daß in allen drei Plasmiden die Insertion an gleichen Positionen nachzuweisen ist.

Eng gekoppelt mit den Transfereigenschaften des RP4-Plasmids

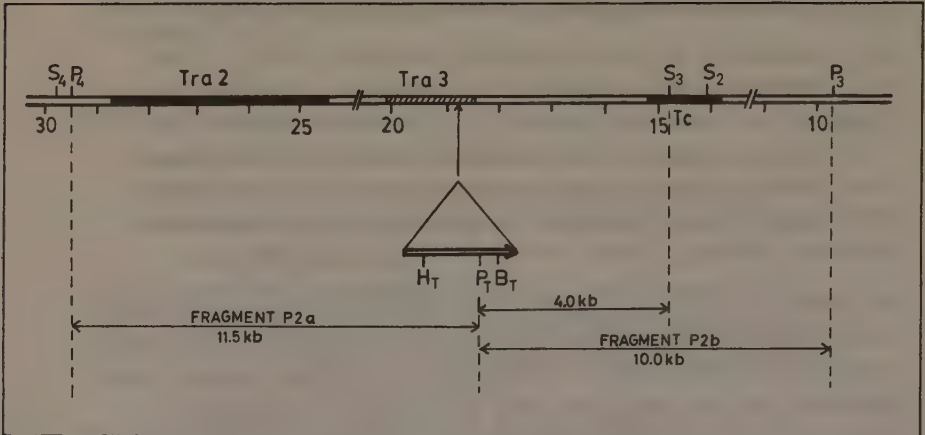


Abb.48: Insertion von ISR1 in der Transferregion Tra3.

Solche Insertionen wurden in drei Tra⁻ Mutanten gefunden. Die Fragmente, die bei Verdauung mit PstI entstehen, zeigen, daß die ISR1-Elemente in allen drei Plasmiden in derselben Orientierung und an derselben Stelle integriert sind. Bei Einteilung des RP4-Plasmids von 0-57.4 (=kb) kartieren die Insertionen ungefähr bei Position 19 und liegen damit innerhalb der von Barth (1979) definierten Tra3-Region.

ist der Sex-Phänotyp (Surface exclusion), also die Hemmwirkung, die ein RP4-Plasmid auf den Eintritt eines zweiten Plasmids in die Wirtszelle ausübt.

Die Untersuchungen von Barth (1979) lassen zwei Sex-Gene erkennen: eins kartiert in der Tra2-Region, das andere in Tra3. Tn7-Insertionen in Tra3 haben neben der Transfernegativität auch den Verlust sämtlicher Sex-Effekte zur Folge. Der Sex-Phänotyp der Tra⁻ Mutanten wurde allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

I.1.2 : Die dreifache Insertion von ISR1 in RP4-5.82

Die Mutante RP4-5.82 soll hier besonders hervorgehoben werden, da sie bisher das einzige Plasmid ist, in dem gleichzeitig drei Kopien von ISR1 inseriert sind.

Die Sequenzen in Tn1 und Tra3 sind in der für ISR1_A- und ISR1_T-Insertionen üblichen Orientierung, also gegenläufig, integriert, während die Insertion innerhalb der Km^r-Determinante die gleiche Polarität aufweist wie ISR1_A (vergl. dazu Abb.22, Seite 74 und Abb.49).

Diese Anordnung ließe theoretisch eine hohe Instabilität der Plasmidmutante erwarten, da zwischen den homologen, direkt repetitiven Sequenzen ISR1_K und ISR1_A Rekombinationsereignisse stattfinden können, die für das RP4-Plasmid letal wären: dem Rekombinationsprodukt ① fehlt die transaktive Replikationsfunktion trfB, die zwischen Tra1 und der EcoRI-Stelle kartiert, während das Derivat ② weder trfA noch den Startpunkt der Replikation (oriV) besäße. Die Folge eines Rekombinationsvorgangs zwischen ISR1_K und ISR1_A wäre demnach der Verlust des RP4-Plasmids.

Im Rahmen der Untersuchungen von RP4::ISR1-Mutanten in E.coli konnte jedoch keine erhöhte Instabilität von RP4-5.82 festgestellt werden. Bei der Analyse von RP4-5.82-tragenden Stämmen (Rec⁺- und Rec⁻-Wirtszellen) traten weder Tc-sensitive Kolonien auf noch konnten in der Agarosegelelektrophorese der Zell-Rohlysate verkürzte Plasmide identifiziert werden.

Nach Cycloserinanreicherung betrug die Verlustrate des Tc^r-Markers zwar 96%, liegt aber in der gleichen Größenordnung wie die der Plasmide RP4-5.81 (100%) oder RP4-13 (71%), die zwei invers orientierte ISR1-Elemente bzw. nur eine Insertion tragen.

Diese Ergebnisse bedeuten, daß das Plasmid RP4-5.82 in E. coli weder vollkommen noch teilweise durch Rekombination eliminiert wird.

Eventuell ist eine solche Rekombination ein äußerst seltenes Ereignis, das in einer Häufigkeit auftritt, die unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Testsystems liegt.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit wäre, daß das RP4-Molekül solche Vorgänge, die zur Selbstzerstörung führen, durch irgendeinen plasmideigenen Schutzmechanismus verhindern kann.

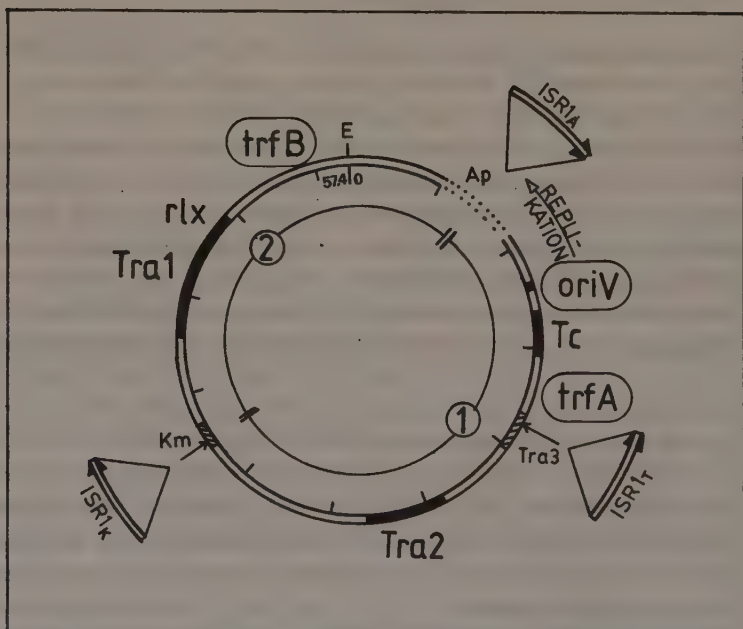


Abb.49: Das Plasmid RP4-5.82 und die möglichen Rekombinationsprodukte ① und ②.

Die Daten über **oriV** (Startpunkt der vegetativen Replikation), die Replikationsrichtung (Pfeil), **trfA** und **trfB** (trans-aktive Replikations-funktionen) und **rlx** ("relaxation complex site" = Startpunkt der Transfer-replikation, **oriT**) sind von Thomas et al. (1979) übernommen.

Die Orientierung der **ISR1**-Insertionen ist wiederum durch Pfeile dargestellt (Pfeilspitze = **BamHI**-Ende). Im Übrigen stimmen die Markierungen mit den bisher gezeigten Darstellungen überein.

I.2 : DELETIONEN IM ZUSAMMENHANG MIT ISR1

Sehr häufig treten in Nachbarschaft der ISR1-Insertionen Deletionen verschiedenen Ausmaßes auf. Der Verlust der Ap-Resistenz ist ausschließlich auf solche Deletionen zurückzuführen, während Km-Sensitivität entweder durch Deletionen oder durch direkte Integration von ISR1 in die Km^r-Genregion hervorgerufen wird. In Verbindung mit der Insertion in Tra3, ISR1_T, war eine Deletion bisher nicht eindeutig nachzuweisen.

I.2.1 : Deletionen in Nachbarschaft von ISR1_A

Aus der Annahme einer spezifischen Integrationsstelle für ISR1 in Tn1 resultiert die Forderung, daß die in Verbindung mit ISR1_A auftretenden Deletionen an den Enden der Insertion beginnen und in beide Richtungen laufen.

Die gefundenen Deletionen variieren beträchtlich in ihrer Ausdehnung. Sie sind in Abbildung 5a schematisch nach ihrer Größe zusammengestellt.

Die kleinste Deletion in Richtung EcoRI (in Plasmid RP4-5.2) umfaßt nur ca. 200 bp, reicht aber aus, um die Ap^r zu zerstören. Daraus resultiert, daß die bla-Genregion in unmittelbarer Nähe der ISR1-Insertion beginnen muß.

Diese Beobachtung stimmt überein mit Ergebnissen von Sutcliffe (1978; 1979), der das Ap^r-Gen des Transposons Tn3, das nahezu identisch ist mit Tn1 (vergl. dazu E.II), sequenzierte. Sutcliffe identifizierte etwa 250 bp links der BamHI-Stelle eine Pribnow-box ähnliche DNA-Sequenz. Das bedeutet, daß die Deletion in RP4-5.2 die Promoter-Region des β -Lactamase-Gens teilweise oder vollständig eliminiert und dadurch zur Ap-Sensitivität führt.

Die größte Deletion in Richtung EcoRI-Stelle beträgt 1700 bp und endet außerhalb des Transposons.

In Richtung der Tc-Resistenzdeterminante endet die längste Deletion (in RP4-5.4) ebenfalls außerhalb von Tn1, kurz vor Position 12 des RP4-Moleküls; eine Deletion über diesen Bereich hinaus wurde nie beobachtet. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Daten von Thomas et al. (1979), die

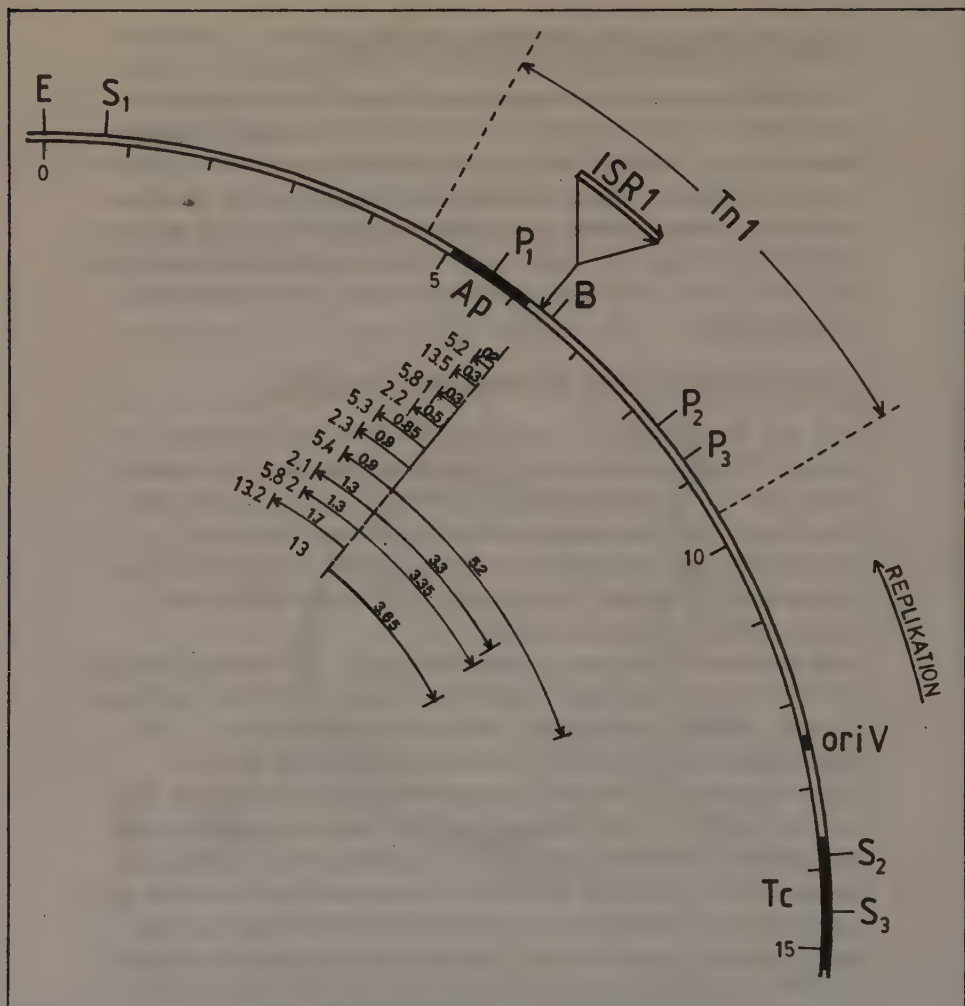


Abb. 50: Schematische Darstellung der im Zusammenhang mit ISR1_A auftretenden Deletionen.

Die innere Skala unterteilt das RP4-Plasmid in 57.4 Einheiten (= kb). Das ISR1-Element ist in demselben Maßstab gezeichnet, die Orientierung der Insertion ist durch einen Pfeil wiedergegeben (Pfeilspitze entspricht BamHI-Ende).

Die Deletionen beginnen jeweils an den Enden von ISR1, ihre Richtung ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die über diesen Pfeilen stehenden Zahlen geben die Länge der Deletionen (in kb) an, während die vorausgestellten Nummern als Abkürzung der jeweiligen Plasmidmutanten (RP4-) zu verstehen sind.

bei Plasmid RK2 in dieser Region (etwa bei Position 12,5) den Startpunkt der vegetativen Replikation (*oriV*) identifizierten (RK2 ist identisch mit RP4).

Die Tatsache, daß Deletionen auftreten, die fast das ganze Transposon eliminieren, widerspricht der von Barth und Grinter (1977) diskutierten Vermutung, daß essentielle Gene des RP4-Plasmids unter der Kontrolle von *Tn1* stehen.

I.2.2 : Deletionen in Nachbarschaft von *ISR1_K*

Nachdem bei den *ISR1_K*-Insertionen nicht von einer definierten Integrationsstelle ausgegangen werden kann, läßt sich über Startpunkt und Richtung der damit verbundenen Deletionen nichts aussagen.

Die meisten Deletionen liegen in den Größenordnungen von 0,9 kb und 1,8 kb (Abb.51). Eine Ausnahme bildet die Mutante RP4-5.4, in der sich die Deletion von der *HindIII*-Stelle bis in die *Tra3*-Region erstreckt und ungefähr 18,5 kb umfaßt. Das Zustandekommen dieser sehr großen Deletion wird am Ende dieses Kapitels gesondert diskutiert.

Unabhängig von der Art der Entstehung beweist diese Deletion in RP4-5.4, daß die DNA-Region zwischen dem *HindIII*-Schnitt und der *Tra3*-Region für die Lebensfähigkeit des RP4-Plasmids nicht notwendig ist. Entsprechende Beobachtungen machten auch Barth und Mitarbeiter (Barth et al., 1979), die zwischen den Transferregionen *Tra1* und *Tra2* keine essentiellen RP4-Gene lokalisieren konnten.

Allerdings ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß Deletionen, die sich von *ISR1_K* aus in Richtung *Tra1* erstrecken, in keinem Fall gefunden wurden. Obwohl die linken Endpunkte wegen der engen Nachbarschaft der beiden *HindIII*-Stellen (*H* auf RP4, *H_K* auf *ISR1_K*) in den meisten Fällen nicht exakt definiert werden können, sind Deletionen, die deutlich über den *HindIII*-Schnitt des RP4-Plasmids hinausgehen, mit Sicherheit auszuschließen.

Daß solche Deletionsmutanten prinzipiell lebensfähig wären, wird an einem Derivat des Plasmids R68 (= RP4) deutlich, in dem die gesamte DNA-Region von der *Km^r*-Determinante bis weit

tungen. Eine kleine Deletion (1.5 kb) beginnt am HindIII-Ende von ISR1 und endet innerhalb der Km^R -Genregion; in der anderen Richtung erstreckt sich eine Deletion von 17 kb Länge über Tra2 in die Transferregion Tra3. Diese Interpretation basiert auf der Überlegung, daß RP4-5.4 möglicherweise ein Derivat der Mutante RP4-2.3 darstellt, da Plasmid RP4-5.4 aus einer Km^S Segregante des Stammes 1-491 (RP4-2.3) (= M137-5) isoliert wurde (vergl. D.III.2).

Auffallend ist allerdings die Tatsache, daß die Deletion in RP4-5.4 ziemlich exakt an der Stelle in Tra3 endet, in der in den anderen Tra^- Mutanten die Insertion von $ISR1_T$ lokalisiert ist (vergl. E.I.1.3). Dieser Endpunkt der Deletion sowie die Orientierung der $ISR1$ -Insertion würden eher für eine der folgenden Interpretationsmöglichkeiten sprechen, die jedoch den oben erwähnten Zusammenhang zwischen RP4-2.3 und RP4-5.4 außer acht lassen:

1. Die Integration von $ISR1$ ist in der Tra3-Region erfolgt, und zwar an derselben Stelle und in derselben Orientierung wie bei den anderen $ISR1_T$ -Insertionen; die Deletion beginnt dann am HindIII-Ende von $ISR1$ und erstreckt sich über Tra2 bis zum HindIII-Schnitt innerhalb der Km^R -Determinante. Die Deletion wäre demnach nicht von einer $ISR1_K$ -Insertion verursacht, sondern stände mit einer $ISR1_T$ -Insertion in Zusammenhang.
2. Der DNA-Verlust ist auch durch folgendes Rekombinationsereignis erklärbar: das Plasmid trägt ursprünglich drei Kopien des $ISR1$ -Elementes und ähnelt in seiner Struktur der Mutante RP4-5.82 (Abb.22, D.II.2.4.2). Im Unterschied zu RP4-5.82 sind die Insertionen $ISR1_K$ und $ISR1_T$ jedoch nicht invers, sondern in der gleichen Orientierung angeordnet. Zwischen diesen homologen, direkt repetitiven Sequenzen kann eine normale Rekombination stattfinden, wobei eine Kopie des $ISR1$ -Elementes und die zwischen den Insertionen liegende RP4-DNA verloren geht. Dieser Vorgang resultiert in der

Struktur, die für die Mutante RP4-5.4 gefunden wurde.

Welche der drei möglichen Mechanismen tatsächlich für die Entstehung der Deletion verantwortlich ist, kann nicht entschieden werden.

E.II : ISR1-BEDINGTE VERÄNDERUNGEN IM TRANSPOSON Tn1

Die Untersuchungen in D.V ergaben zwei wesentliche Unterschiede zwischen Tn1::ISR1 und dem Wildtyp-Transposon. Zum einen konnte gezeigt werden, daß Tn1::ISR1 wesentlich häufiger transponiert als Tn1 (Faktor 10 bzw. 22); zum anderen wurde festgestellt, daß Tn1::ISR1-tragende Plasmide zwei Proteine synthetisieren, die im Proteinmuster von Tn1 nicht auftreten (vergl. PAA-Gel. Abb.46). Um diese Resultate erklären zu können, ist es notwendig, die bisher über Tn1 bekannten Daten näher vorzustellen.

II.1 : DAS TRANSPOSON Tn1

Die von RP4 vermittelte Ap-Resistenz wird durch eine TEM- β -Lactamase hervorgerufen, deren Produktion auf einem Transposon codiert ist (Datta et al., 1971; Richmond und Sykes, 1972; Hedges und Jacob, 1974).

Transposons (abgekürzt Tn's) können als größere DNA-Segmente definiert werden, die phänotypisch erkennbare Eigenschaften exprimieren und als diskrete Einheiten recA-unabhängig translocieren (vergl. E.III.1). Sie bestehen aus einer zentralen DNA-Region, die flankiert wird von kurzen terminalen Sequenzen, die entweder direkt (z.B. Tn9), im allgemeinen aber invers repetitiv angeordnet sind.

Ap^r-vermittelnde Transposons wurden auf vielen verschiedenen R-Plasmiden identifiziert, erwiesen sich aber zum Teil als identisch. Zum Beispiel zeigen folgende Transposons in elektronenmikroskopischen Heteroduplex-Studien vollkommene Sequenz-Homologie (Heffron et al., 1975b; Rubens et al., 1976; Heffron et al., 1977a; Yamada et al., 1979):

- | | |
|--------|---|
| Tn1 | von RP4 aus <i>Pseudomonas</i> (Hedges und Jacob, 1974) |
| Tn2 | von RSF1030 aus <i>Salmonella</i> (Heffron et al., 1975b) |
| Tn3 | von R1-19 aus <i>Salmonella</i> (Kopecko und Cohen, 1975) |
| Tn1701 | von NTP1 aus <i>Salmonella</i> (Yamada et al., 1979). |

Die Eigenschaften des Transposons Tn3 sind bisher am aus-

fürhlichsten untersucht. Obwohl den Heteroduplex-Experimenten nur eine Genauigkeit von 90% zukommt, kann man annehmen, daß Tn1 dem Transposon Tn3 zumindest sehr ähnlich ist, so daß die Daten, die für Tn3 beschrieben sind, im wesentlichen auch auf Tn1 übertragen werden können.

II.2 : STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE ORGANISATION DES TRANSPOSONS

II.2.1 : Die β -Lactamase

Lange Zeit waren als Genprodukte von Tn1/Tn3 definitiv nur die verschiedenen Formen der β -Lactamase (bla) beschrieben: das größte der drei nachzuweisenden Proteine wurde als Vorstufe (precursor) angesehen, das mittlere konnte als die aktive Form der β -Lactamase identifiziert werden und das kleinste wurde als Abbauprodukt interpretiert.

Daneben wurde noch eine transposoncodierte, transaktive Transpositionsfunktion gefordert, da transpositionsdefekte Mutanten isoliert wurden, die durch ein gleichzeitig vorhandenes Wildtyp-Transposon komplementiert werden konnten (Heffron et al., 1977b).

Dougan und Sherratt (1977) bestimmten die Molekulargewichte der drei bla-Proteine mit 32 K, 30 K und 28 K und beschrieben eine zusätzliche, sehr schwache Peptidbande mit ca. 20 K, in der sie das Produkt einer außerhalb von Tn1 startenden Transkription vermuteten.

Inselburg und Applebaum (1978), die die Molekulargewichte der Tn3-codierten β -Lactamase mit 31.000, 29.000 und 28.000 angeben, beobachteten in manchen Fällen noch zwei zusätzliche Proteine mit MW 21.000 und 18.000, denen sie jedoch keine Funktion zuordnen konnten.

Etwa zur gleichen Zeit wurde von Sutcliffe (1978) die Nukleotidsequenz des Ap-Resistenzgens auf pBR322 (bla-Gen von Tn3) aufgeklärt und die Transkriptionsrichtung

bestimmt.

II.2.2 : Das Regulationsprotein

Im April 1979 erschien dann eine Arbeit von Dougan und Mitarbeitern (Dougan et al., 1979), in der insgesamt vier Tn1/Tn3-spezifische Polypeptide beschrieben werden: 3 Proteine (MW 30.000, 28.000 und 25.000) als Genprodukte des Ap^R-Gens und ein viertes Protein (MW ca. 19.000), dessen Codierregion im Bereich des BamHI-Schnittes lokalisiert werden konnte.

Mutanten, die dieses Polypeptid nicht mehr synthetisierten, zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhte Transpositionsfrequenz und lieferten ungewöhnliche Transpositionsprodukte. Daher vermuteten die Autoren für das 19.000 d Protein einen Zusammenhang mit der Regulation der Transposition.

Diese zwei Genregionen (bla-Gen und "Regulationsgen") beanspruchen zusammen etwa 1.8 kb; für die übrigen 3 kb des Transposons (Codierkapazität etwa 100.000 d) fanden die Autoren keine Genprodukte.

Mit diesem Hintergrund versuchten wir die zwei neu auftretenden Proteine in Tn1::ISR1 folgendermaßen zu erklären. Wir postulierten einen Promoter auf ISR1 und vermuteten in dem großen Protein B (>100.000) ein Transkriptionsprodukt der "silent region" auf Tn1, das von diesem ISR1-Promoter aus abgelesen wird.

Da durch Restriktionsanalyse die Integrationsstelle von ISR1 dicht neben dem BamHI-Schnitt identifiziert war, mußte die Insertion im Codierbereich des 19.000 d Proteins liegen. Damit ergaben sich für Protein A (16.500 d) zwei Möglichkeiten, je nach Transkriptionsrichtung dieses Gens: entweder ist Protein A ein durch ISR1-Insertion verkürztes 19.000 d Protein, oder es wird von ISR1 selbst codiert (ISR1 besitzt eine Codierkapazität von 383 AS = 44.000 d).

II.2.3 : Gesamtstruktur von Tn3: Tn3-Gene und ihre Regulation

Innerhalb kurzer Zeit erschienen dann verschiedene Arbeiten über Transposon Tn3 (Sequenz- und Proteinanalysen), deren Ergebnisse in Abb.52 zusammengefaßt sind (Chou et al., 1979a,b; Gill et al., 1979; Heffron et al., 1979).

Die exakte Länge des Transposons beträgt 4957 bp (Heffron et al., 1979); die invers repetitiven Sequenzen an den Enden wurden mit 38 bp bestimmt (Ohtsubo et al., 1979). Neben der Genregion für die β -Lactamase-Produktion (bla-Gen) sind auf Tn3 noch zwei transaktive Funktionen determiniert, d.h. Polypeptide, die eine entsprechende Tn3-Mutation in trans komplementieren können. Diese Proteine sind die Transposase (MW 100.000 - 120.000), die von Gen tnpA codiert wird und der Tn3-spezifische Repressor (MW 19.000 - 21.000), dessen Codierregion mit tnpR bezeichnet wird. Diese drei Gene (bla, tnpA, tnpR) beanspruchen fast die gesamte Codierkapazität des Transposons (bis auf 350 bp).

Die bidirektional exprimierten Gene tnpR und tnpA bilden eine Regulationseinheit. Der tnpR-codierte Repressor kontrolliert zum einen die von seinem Promoter aus startende Transkription und reprimiert damit seine eigene Synthese. Im Normalfall wird durch diese Selbstregulation eine zwar beschränkte, aber immer ausreichende Produktion des Kontrollenzym sicher gestellt. Dieser geringe Level an Repressormolekülen ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, daß dieses Tn3-Genprodukt lange Zeit nicht gefunden wurde und auch im Proteinmuster der Tn1-tragenden Plasmide (vergl. D.V.2) nicht nachzuweisen ist.

Gleichzeitig reduziert der Tn3-Repressor aber auch die Transkription des tnpA-Gens. Das tnpA-Genprodukt, die Transposase, wird daher nur in einem sehr geringen Maße synthetisiert ($< 0.001\%$ des Gesamtproteins). Die Bezeichnung Transposase bedeutet, daß diesem Enzym alle für die Transposition notwendigen Funktionen zugesprochen werden.

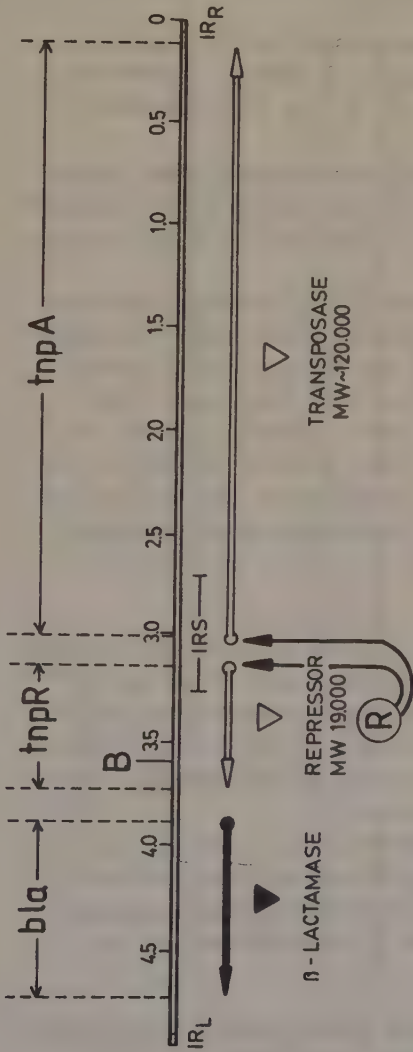


Abb. 52: Tn3-spezifische Gene und ihre Regulation (Chou et al., 1979a,b; Gill et al., 1979; Heffron et al., 1979).

Die Skala unterteilt das 4957 bp lange Transposon in Untereinheiten von jeweils 500 bp. IR_L und IR_R markieren die invers repetitiven Sequenzen an beiden Enden von Tn3. Die Transkriptionsrichtungen der drei Genregionen sind durch die dicken Pfeile angegeben; die weißen Pfeile sollen dabei die reprimierte Transkription der Gene $tnpR$ (Repressor) und $tnpA$ (Transposase) verdeutlichen, die unter der Kontrolle des Repressorproteins (R) steht. Die Synthese der β -Lactamase (bla) ist nicht reduziert (schwarzer Pfeil). Die mit IRS gekennzeichnete DNA-Region ist eine für einen vollständigen Translokationsablauf notwendige Nukleotidsequenz (internal resolution site).

Die Regulation dieses Proteins gewährleistet daher eine sinnvolle Transpositionsfrequenz.

II.3 : DIE PROTEINE VON Tn1::ISR1

Die Situation in Tn1::ISR1 kann analog zu Tn3 durch das in Abb. 53 skizzierte Modell dargestellt werden, das für die Synthese der zwei Proteine A und B eine einleuchtende Erklärung erlaubt.

Nach den Ergebnissen der Restriktionsanalyse liegt die Integrationsstelle von ISR1 in Tn1 sehr dicht links der BamHI-Stelle. Die ISR1-Insertion ist damit im linken äußeren Ende des Gens tnpR lokalisiert.

Wir vermuten, daß die ISR1-Insertion zu einem vorzeitigen Abbruch des tnpR-codierten Proteins führt: anstelle eines Repressors mit MW 19.000 wird ein Polypeptid der Größe 16.500 d synthetisiert, ein inaktives Repressorprotein (R*), das weder seine eigene Transkription, noch die der tnpA-Genregion kontrollieren kann. Als Folge davon werden beide Genprodukte, der inaktive Repressor (MW 16.500) und die Transposase (MW 120.000) in erhöhtem Maße exprimiert und treten im Proteinmuster als deutliche Banden in Erscheinung.

Diese Interpretation erklärt auch die Beobachtung, daß die Transpositionsfrequenz von Tn1::ISR1 in Rec⁺-Zellen um Faktor 14, in Rec⁻-Zellen um Faktor 22 höher liegt als die des Wildtyp-Transposons (vergl. D.V.1.3). Diese erhöhte Transpositionshäufigkeit ist durch die gesteigerte Produktion der Transposase zu erklären.

Eine Zunahme der Transpositionsfrequenz wurde auch bei Tn3-Mutanten, die Mutationen, Deletionen oder Insertionen in dem heute als tnpR-Gen identifizierten Nukleotidbereich tragen, beobachtet (Gill et al., 1978; Heffron et al., 1978; Dougan et al., 1979).

Das vorgestellte Modell hat für ISR1 folgende Konsequenzen:

- durch die Proteinanalyse von Tn1::ISR1 in E.coli-Minizellen konnten keine ISR1-spezifischen Proteine

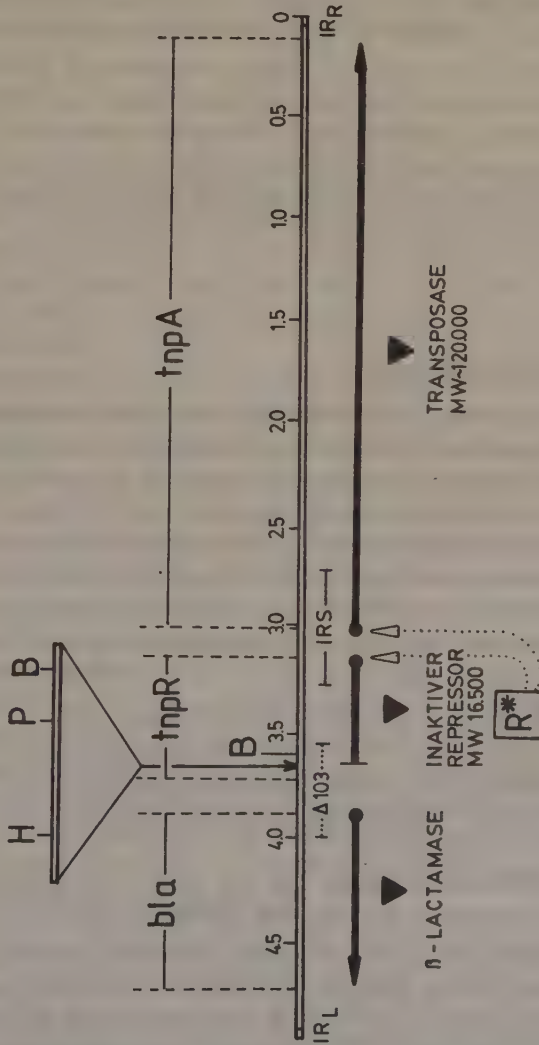


Abb.53: Modell für Transposon Tn1::ISR1.

Die Darstellung des Transposons entspricht den in Abb.52 gezeigten Tn3-Daten. An der ISR1-Insertionsstelle (↓) bricht vermutlich die Expression des tnpR-Gens vorzeitig ab: es entsteht ein verkürztes, inaktives Repressorprotein (**R***). Als Folge davon werden die Gene tnpR und tnpA konstitutiv transkribiert (schwarze Pfeile). Auf die von Sherratt und Arthur (1980) beschriebene Deletion Δ103 wird in Kapitel E.II.4 eingegangen.

identifiziert werden. Damit kann aber eine Codier-region oder ein Promoter auf ISR1 nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Es könnte sein, daß die gewählten Bedingungen für die Expression ISR1-codierter Gene oder für die Aktivierung eines Promoters auf ISR1 ungeeignet waren (eventuell Verwendung eines *R.lupini*-Minizellensystems).

- die Insertion von ISR1 in eine Genregion führt zur Verkürzung des codierten Genprodukts. Daraus resultiert die Forderung eines auf ISR1 lokalisierten Terminations-signals, das entweder auf Ebene der Transkription oder der Translation wirksam ist.

II.4 : CISAKTIVE Tn3-FUNKTIONEN

Neben den transdominanten (transaktiven) Funktionen (Repressor, Transposase) besitzt Tn3 noch drei cisaktive Funktionen, die für einen vollständigen Transpositionsablauf essentiell sind (Gill et al., 1978; Heffron et al., 1979).

Cisaktiv oder cisdominant bedeutet, daß Mutationen in diesen Funktionsregionen nicht durch ein Wildtyp-Tn3 komplementiert werden können. Es handelt sich also nicht um Polypeptide, sondern um bestimmte Nukleotidsequenzen auf dem Transposon.

Sowohl die rechte als auch die linke 38 bp-Sequenz der invers repetitiven Enden (IR_R , IR_L) sind für eine Transposition absolut notwendig. Sie dienen wahrscheinlich als Erkennungssequenz für ein Translocationsenzym, vermutlich für die Transposase.

Genetische Untersuchungen ergaben, daß Tn3 noch eine dritte cisaktive Funktion besitzt, die als IRS (Internal Resolu-tion Site) bezeichnet wird (Gill et al., 1978; Heffron et al., 1979) (vergl. Abb.52, Abb.53). Deletionen im Bereich zwischen den Nukleotiden 2726 bis 3272 resultieren in Rec^- -Stämmen in Transpositionsprodukten, die sich aus dem Donor-replikon, dem Rezipientenreplikon und zwei direkt repetitiv angeordneten Kopien des Transposons an den Verbindungs-

stellen zusammensetzt.

Es wird vermutet, daß solche Cointegrate als normale Intermediate bei der Transposition auftreten und daß die Funktion der IRS-Region darin besteht, diese fusionierten Moleküle durch Rekombination aufzulösen. Auf die einzelnen Stufen des Transpositionsablaufes kann im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden. Es wird hierzu auf die Modelle von Gill et al. (1978), Grindley und Sherratt (1979), Shapiro (1979) und Arthur und Sherratt (1979) verwiesen.

Die DNA-Sequenzanalyse von Heffron und Mitarbeitern ergab, daß innerhalb des Amino-Terminus der Transposase eine 23-Nukleotidsequenz der IRS-Region starke Homologie mit den invers repetitiven Enden zeigt. Das ließe vermuten, daß die Resolution der Cointegrate von der Transposase abhängig ist.

Sherratt und Arthur (1980) dagegen behaupten, daß für die Tn1/Tn3-spezifische Rekombination weder das tnpA-Genprodukt noch das an tnpA grenzende Transposonende (IR_R in Abb. 52 und Abb. 53) notwendig seien. Sie beschreiben eine Transposonmutante, in der die Region zwischen dem linken Ende von tnpR und dem rechten Ende von bla deletiert ist (Tn103: Ap^S , $tnpR^-$, Tp^+ ; Abb. 53). Diese Deletionsmutante liefert als Transpositionsprodukte Cointegrate, die in $recA^-$ -Zellen stabil vorliegen, in einem $recA^+$ -Wirt oder in Gegenwart eines WT-Transposons aber aufgelöst werden. Die Mutation ist also in trans komplementierbar. Daher postulieren die Autoren, daß für das $recA$ -unabhängige Tn1/Tn3-spezifische Rekombinationssystem neben der cis-dominanten IRS-Sequenz noch eine transaktive Funktion benötigt wird. Dieses Peptid codiert in der in Tn103 deletierten tnpR-Genregion ($\Delta 103$ in Abb. 53), ist allerdings nicht unbedingt identisch mit dem Repressorprotein.

Die ISR1-Insertion in Tn1::ISR1 liegt in dem Bereich, in dem auch die Deletion der Mutante Tn103 kartiert. Sollte ein Genprodukt dieser tnpR-Region tatsächlich für die Rekombination notwendig sein, würde die Transposition von Tn1::ISR1 in Rec^- -Zellen zu stabilen Cointegraten füh-

ren, während im Rec^+ -Wirt die fusionierten Moleküle durch das zelluläre Rekombinationssystem aufgelöst werden. Die Entstehung normaler Transpositionsprodukte im Rec^+ -Wirt wurde an mehreren Beispielen gezeigt ($\text{ColE1}::(\text{Tn1}::\text{ISR1})$, pWK25.22 , $\text{pFS2o2}::(\text{Tn1}::\text{ISR1})$): die in den isolierten Kolonien auftretenden Plasmide wiesen jeweils die nach Insertion von $\text{Tn1}::\text{ISR1}$ erwartete Längenzunahme auf. Da zum Zeitpunkt der Experimente die Untersuchungen von Sherratt und Arthur noch nicht bekannt waren, wurde zwar die Transpositionsfrequenz von $\text{Tn1}::\text{ISR1}$ in Rec^- -Zellen getestet, leider wurde aber auf eine Analyse der in Rec^- -Stämmen auftretenden Transpositionsprodukte verzichtet.

E.III : ISR1 - EIN NEUES IS-ELEMENT?

Die im folgenden angegebenen Daten über transponierbare Elemente allgemein und IS-Elemente im besonderen stützen sich auf Arbeiten von Starlinger und Saedler (1976), Cohen (1976), Kleckner (1977), Bukhari et al.(1977), Nevers und Saedler (1977), Kopecko (1979), Calos und Miller (1980) und Starlinger (1980).

III.1 : DEFINITION UND ALLGEMEINE MERKMALE VON TRANSLOCIERBAREN ELEMENTEN

Der Ausdruck "transponierbare Elemente" (transposable elements) wurde erstmals von McClintock (1952) verwendet, um bewegliche genetische Elemente in Mais zu definieren. Er wird heute allgemein zur Charakterisierung beweglicher DNA-Sequenzen in eukaryotischen und prokaryotischen Systemen benutzt (Bukhari et al., 1977).

In den letzten 10 bis 15 Jahren wurde eine Vielzahl solcher DNA-Segmente in bakteriellen Chromosomen, Plasmiden und Bakteriophagen identifiziert.

Definitionsgemäß sind transponierbare Elemente in der Lage, als genetische und physikalische Einheiten von einer Stelle eines Genoms zu einer anderen Stelle des gleichen oder eines anderen Genoms in der gleichen Zelle zu wechseln (Transposition, Translocation). Vermutlich sind die terminalen, meist invers repetitiven DNA-Sequenzen, durch die transponierbare Elemente strukturell gekennzeichnet sind, an diesem Prozeß beteiligt. Die Integration des DNA-Elements an der neuen Stelle kann dabei in jeder der beiden Orientierungen stattfinden.

Da diese Translocationsereignisse auch in rekombinationsdefekten ($recA^-$) Bakterienzellen auftreten, laufen sie unabhängig von dem zellulären System ab, das normalerweise für eine allgemeine homologe Rekombination benötigt wird. Man spricht daher von einer nicht-homologen, $recA$ -unabhängigen (illegitimen) Rekombination.

Für kein transponierbares Element wurde bisher eine eigene Replikation oder ein autonomer physikalischer Zustand nachgewiesen. Sie kommen nur als linear inserierte Moleküle in einem Wirtsgenom vor und werden von diesem mitrepliziert.

Translocierbare Elemente können nach ihrer Komplexität in drei Kategorien eingeteilt werden:

- IS-Elemente: Sie sind im allgemeinen kleiner als 2 kb und tragen außer Insertionsfunktionen keine erkennbaren Gene.
- Transposons: Unter dieser Bezeichnung faßt man größere DNA-Segmente (2000 - 50.000 bp) mit phänotypisch erkennbaren Genen zusammen; sie codieren meist für Antibiotika-Resistenzen (z.B. Tn1), aber auch für Quecksilber-Resistenz (z.B. Tn501; Stanisich et al., 1977; Bennett et al., 1978) oder für Enzyme, die am Metabolismus von Lactose (Tn951; Cornelis et al., 1978) oder Raffinose (Tn(Raf); Schmitt et al., 1979) beteiligt sind.
- Bakteriophagen: Als Beispiel sei hier der Phage Mu genannt, der in viele Stellen des Bakterienchromosoms oder in Plasmide über illegitime Rekombination integriert und dort mit einer hohen Frequenz Mutationen mit z.T. polaren Effekten verursacht.

III.2 : ENTDECKUNG UND KLASSTIFIZIERUNG VON IS-ELEMENTEN

Ende der 60iger Jahre wurden Mutationen beschrieben, deren polare Effekte viel stärker ausgeprägt waren als in Non-sense- und Frameshift-Mutationen und die sich von Punktmutationen grundsätzlich durch ihre hohe Reversionsrate unterschieden. Durch verschiedene Methoden wurde gezeigt, daß diese Mutationen mit der Insertion diskreter DNA-Elemente verbunden waren. Da die gleichen Insertionen in verschiedenen Operons auftraten und daher nicht durch Transposition zufälliger DNA-Sequenzen erklärt werden konnten, wurden sie IS ("inserted sequence")-Elemente ge-

nannt und in verschiedene nicht-homologe Klassen eingeteilt. Die häufigsten und best-charakterisierten IS-Elemente sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Diese im weiteren mit "klassisch" bezeichneten IS-Elemente sind natürliche Bestandteile des *E.coli*-Chromosoms und wurden auch auf Plasmid- und Phagen-genomen entdeckt. Inzwischen wurden sie z.T. auch in den verwandten Arten *Salmonella*, *Citrobacter* und *Shigella* und in dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* (Saedler und Ghosal, 1977) nachgewiesen.

Für andere Organismen sind daneben auch noch IS-ähnliche Elemente beschrieben, z.B. für *Proteus* (Ohtsubo und Ohtsubo, 1977), *Streptomyces* (Bibb und Hopwood, 1978), *Streptococcus* (Yagi und Clewell, 1977) und *Staphylococcus* (Novick et al., 1979). Allerdings ist die Sequenzverwandschaft zwischen diesen und den klassischen Elementen bisher noch nicht untersucht.

Trotz seiner Größe (ca. 5800 bp) zählen manche Autoren auch die $\gamma\delta$ -Sequenz, die in *E.coli* auf dem Chromosom und dem F-Plasmid gefunden wurde (Sharp et al., 1972), zu den IS-Elementen.

III.3 : ISR1 IM VERGLEICH ZU KLASSISCHEN IS-ELEMENTEN

In diesem Kapitel soll dargelegt werden, ob und inwieweit das Element ISR1 den generellen Merkmalen von IS-Elementen entspricht und wo Gegensätze und Abweichungen auftreten. Dazu werden die Eigenschaften von ISR1 den Merkmalen gegenübergestellt, die speziell für IS-Elemente kennzeichnend sind.

Da entsprechende Versuche zeigten, daß ISR1 in *E.coli* fast vollkommen inaktiv ist (vergl. D.IV), soll im folgenden nur das Verhalten von ISR1 in *R.lupini* berücksichtigt werden. Die Inaktivität in *E.coli* wird in E.IV.2 diskutiert.

a) Länge:

Die Länge von ISR1 entspricht mit 1,15 kb der für IS-Elemente charakteristischen Größe (<2 kb) und liegt im Bereich

Name	Länge in bp	Vorkommen	Mutationen	Restriktions- stellen	Literatur
IS1	768	E.coli S.typhimurium Citrobacter Tn9 P1, Mu F, R1, R6, R100	polar in Orien- tierung I und II	PstI (1)	Bukhari et al. (1977) Starlinger und Saedler (1976) Ohtsubo und Ohtsubo (1978) Johnsrud (1979)
IS2	1327	E.coli λ F, R5, R100	polar in Orien- tierung I, Promoter in II	HindIII (1) SmaI (1)	Bukhari et al. (1977) Ghosal et al. (1979)
IS3	1200 (ca)	E.coli Tn10 F, R6-5	polar in Orien- tierung I	HindIII (2) PstI (1)	Bukhari et al. (1977)
IS4	1400 (ca)	E.coli	polar in Orien- tierung I	?	Bukhari et al. (1977)
IS5	1250 (ca)	E.coli λ	polar in Orien- tierung I und II	EcoRI	Bukhari et al. (1977) Chow and Broker (1978)

Tab. 11: Die wichtigsten IS-Elemente und einige ihrer Eigenschaften.

Bei der Angabe der Restriktionsstellen sind nur die Enzyme berücksichtigt, die auch in der vor-
liegenden Arbeit verwendet wurden. Die in Klammern stehenden Ziffern geben die Anzahl der je-
weiligen Erkennungsstellen an.

der Sequenzen IS2, IS3, IS4 und IS5 (vergl. Tab. 11).

b) Restriktionsstellen:

Die auf ISR1 nachgewiesenen Schnittstellen für die Enzyme HindIII, PstI und BamHI stimmen mit keinen der für klassische IS-Elemente beschriebenen Schnittspezifitäten überein (vergl. Tab. 11).

Obwohl bisher noch keine Nukleotidsequenz von ISR1 vorliegt, kann man dadurch mit einiger Sicherheit ausschließen, daß ISR1 mit einem der klassischen IS-Elemente identisch ist.

c) Integrationsspezifität

Die Integration von IS-Elementen ist weder so zufällig wie die des Phagen Mu, noch so spezifisch wie die des λ -Phagen in den attB-Locus. Man spricht hier von einer "regionalen" Spezifität; das bedeutet, daß die IS-Elemente bestimmte kurze DNA-Segmente auf dem Rezipienten-Genom bevorzugen, daß innerhalb dieses definierten DNA-Bereichs die Integration aber an (beliebig) vielen, dicht benachbarten Stellen erfolgen kann.

Die Insertion kann dabei grundsätzlich in beiden Orientierungen stattfinden.

Die Untersuchungen von RP4::ISR1-Mutanten ergab, daß ISR1 ebenso wie die IS-Elemente ein Integrationsverhalten zeigt, daß man als "regionale" Spezifität interpretieren kann. ISR1 scheint bevorzugt in drei Regionen des RP4-Moleküls zu integrieren, wobei die Insertionshäufigkeit in der Reihenfolge Tn1 - Km^r - Tra3 deutlich abnimmt (vergl. Tab. 10, E. I. 1). Von insgesamt 16 untersuchten RP4-Mutanten tragen alle 16 eine Insertion in Tn1 (ISR1_A), 11 Moleküle zeigen gleichzeitig eine Insertion in oder in Nähe der Km^r-Determinante (ISR1_K) und in nur drei Mutanten war eine Insertion in der Transferregion Tra3 (ISR1_T) nachzuweisen.

In Kapitel E. I. 1 wurde diskutiert, daß die ISR1-Elemente in Tra3 und in Transposon Tn1 immer an der gleichen Stelle

inseriert sind. Die Exaktheit dieser Aussage ist aber beschränkt durch die Meßgenauigkeit von Restriktionskartierungen, die in diesem Fall bei ± 50 bp liegen dürfte.

Der Ausdruck "definierte" oder "spezifische" Integrationsstelle bedeutet daher nicht, daß ISR1 nachweislich immer exakt zwischen den gleichen Nukleotiden inseriert ist. Es ist durchaus möglich (sogar wahrscheinlich), daß ISR1 innerhalb eines kurzen DNA-Bereichs (ca. 50 bp) in verschiedenen Mutanten an unterschiedlichen, dicht benachbarten Stellen inseriert ist, die durch Restriktionsanalyse nicht aufgetrennt werden können. Für die Insertion von ISR1 in Tra3 und Tn1 kann man also eine "regionale" Integrationsspezifität annehmen, so wie sie auch für klassische IS-Elemente beschrieben ist.

Auffallend ist aber, daß die ISR1-Insertionen in Tn1 und Tra3 immer in der gleichen Orientierung beobachtet wurden. Es scheint in diesen Bereichen eine Integrationspezifität nicht nur hinsichtlich der Insertionsstelle, sondern auch in Bezug auf die Orientierung zu existieren. Eine solche "Richtungsspezifität" der Integration ist für klassische IS-Elemente nicht beschrieben.

Daß ISR1 jedoch grundsätzlich in beiden Orientierungen inserieren kann, wird zum einen darin erkennbar, daß $ISR1_A$ und $ISR1_T$ gegenläufig integriert sind, zum anderen an den $ISR1_K$ -Insertionen.

Im Bereich der Km^R -Determinante ist ISR1 in verschiedenen Mutanten aber nicht nur in jeder der beiden Orientierungen inseriert, sondern auch an deutlich unterscheidbaren Stellen. Allerdings scheinen diese Insertionen "geclustert" zu sein: sie liegen alle zwischen der HindIII-Stelle des RP4-Plasmids, H, und der PstI-Stelle P_5 , also in einer Region von knapp 2 kb (vergl. Abb. 51, E.I.2.2).

d) Transpositionsfrequenz, Mutationen und polare Effekte:
Da auf IS-Elementen keine erkennbaren Gene lokalisiert sind, wird eine Transposition phänotypisch nur an der Entstehung von Mutationen erkennbar. Deswegen werden die bei-

den Vorgänge der Transposition und der Mutationsauslösung hier gemeinsam betrachtet.

Die Häufigkeit, mit der IS-Elemente in eine neue Stelle auf dem gleichen oder einem anderen Replikon inserieren, ist relativ niedrig und liegt kaum über der Spontanmutationsrate. Die Insertion von IS-Sequenzen in das gal- oder lac-Operon von *E.coli* kann zum Beispiel in einer Rate von 1 unter 10^7 Zellen gefunden werden. In manchen Fällen werden auch Frequenzen von 10^{-5} beobachtet.

Mit der Integration eines IS-Elements in ein Strukturgen ist automatisch die Inaktivierung dieses Gens verbunden. Daneben üben alle translocierbaren Sequenzen polare Effekte auf die Expression distaler Gene eines Operons aus. Das bedeutet, die Integration eines IS-Elements innerhalb eines Operons zerstört nicht nur die Expression des Gens, in das die Sequenz inseriert ist, sondern reduziert in hohem Maße auch die Expression von Genen, die promoterdistal zur Insertion liegen (100-1000fache Reduktion). Die Entstehung der polaren Mutationen ist nicht vollkommen verstanden und wahrscheinlich für verschiedene IS-Elemente unterschiedlich.

Für IS2 ist eine rho-sensitive Terminationsstelle nachgewiesen, die für die Polarität in Orientierung I verantwortlich ist. Über die polaren Effekte in Orientierung II gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Die frühere Vorstellung, IS2 sei polar in Orientierung I und besäße einen Promoter in Orientierung II (vergl.Tab.11), ist wahrscheinlich zu einfach. Für IS1 sind Nonsense-Codons in allen drei Leserastern innerhalb der ersten 100 Nukleotide vorhanden; ein Signal für die Termination der Transkription durch den Faktor rho konnte nicht nachgewiesen werden. Unverstanden ist daher die Beobachtung, daß nach IS1-Insertion in vivo in Wildtypstämmen Termination der Transkription stattfindet, die in Mutanten, die ein verändertes oder defektes rho-Protein synthetisieren, teilweise unterdrückt ist.

Die Translocation von ISR1 konnte im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen nur in Bezug auf das RP4-Plasmid

beobachtet werden.

Die Häufigkeit, mit der ISR1 auf dem Genom von RP4 zu finden ist und innerhalb des Moleküls translociert, ist extrem hoch und liegt deutlich über den Transpositions-frequenzen der klassischen Elemente. Da alle untersuchten RP4-Mutanten mindestens eine ISR1-Insertion tragen und nicht alle Insertionen phänotypisch durch Mutationen erkennbar werden, muß man eine Translocationsrate annehmen, die größer ist als die Mutationsrate des RP4-Plasmids ($>10^{-1}$ bis 10^{-2}). Hierbei wird allerdings von der Vorstellung ausgegangen, daß ISR1 als natürliche Sequenz im *R.lupini*-Chromosom vorliegt und von hier aus auf das RP4-Molekül translociert. Hinweise für diese Vermutung werden in E.IV.1 diskutiert.

Die Insertion von ISR1 in ein Strukturgen führt genau wie bei allen translocierbaren Elementen zur Funktionsstörung dieses Gens (z.B. Insertionen in *Tra3* oder in die Km^R -Gen-region).

Insertionen in ein Operon und damit der Nachweis polarer Effekte ist in dem untersuchten System nicht möglich.

Die Interpretation der von *Tn1::ISR1* synthetisierten Proteine (vergl. E.II.3) macht ein Terminationssignal auf ISR1 wahrscheinlich, das entweder auf der Stufe der Translation oder bereits auf Transkriptionsebene wirksam ist.

e) Reversionsrate:

Die Funktion eines durch ein IS-Element inaktivierten Gens wird mit einer Häufigkeit von 10^{-6} bis 10^{-9} wieder hergestellt, abhängig vom IS-Element, seiner Orientierung und dem betroffenen Gen.

Die Reversion setzt eine präzise Exzision des IS-Elements voraus und bedeutet, daß die ursprüngliche Integration normalerweise ohne Veränderung der Wildtyp-Nukleotidsequenz erfolgte.

Ebenso wie die Transposition ist die Exzision ein *recA*-unabhängiger Vorgang.

Bei RP4::ISR1-Mutanten waren in *R.lupini* eindeutige spontane Rückmutationen nicht zu beobachten. Allerdings wurden entsprechende Versuche mit dieser speziellen Fragestellung nicht durchgeführt.

f) Deletionsbildung:

Alle translocierbaren Elemente stimulieren die Entstehung von Deletionen in ihrer Nachbarschaft. Die Deletionsfrequenz ist dabei oft ebenso hoch oder höher als die Transpositionsrate und liegt meist deutlich über der Spontanrate.

Die Gegenwart von IS1 oder IS2 z.B. innerhalb eines Operons erhöht die Deletionsbildung um das 100fache und führt zu einer Deletionsfrequenz von 10^{-4} .

Die von IS-Elementen induzierten Deletionen können eine Länge von einigen 100 bp bis zu 20.000 bp haben und zeigen im allgemeinen eine charakteristische Struktur: die Deletion startet an einem Ende des IS-Elements und dehnt sich von hier aus in benachbarte Nukleotidsequenzen bis zu verschiedenen, aber nicht beliebigen Endpunkten aus. Das inserierte Element selbst bleibt intakt. Ohtsubo und Ohtsubo (1978) zeigten für IS1, daß der Endpunkt der Deletion exakt zwischen dem letzten Nukleotid der IS-Sequenz und dem ersten Nukleotid des Rezipienten-Genoms lokalisiert ist.

Die Deletionen können sich entweder in der einen oder in der anderen Richtung erstrecken; Deletionen nach gleichzeitig beiden Orientierungen sind für die klassischen IS-Elemente nicht beschrieben.

Zumindest für IS1-induzierte Deletionen ist in *E.coli* anscheinend eine chromosomale Funktion notwendig, die bei ca. 61 Minuten auf der *E.coli*-Karte codiert ist (Nevers und Saedler, 1978). Zellen, denen diese Funktion fehlt, zeigen eine 90-99%ige Abnahme der IS1-stimulierten Deletionen. Außerdem scheint die IS1-bedingte Deletionsbildung temperaturabhängig zu sein, da die Frequenz bei 42°C um das 10-100fache erniedrigt ist (im Vergleich zu 32°C) (Reif und Saedler, 1977).

Bei ISR1 ist diese Eigenschaft, in Nachbarschaft der Insertionsstellen die Entstehung von Deletionen zu stimulieren, besonders stark ausgeprägt, zumindest was die Insertionen in Tn1 und in Nähe der Km^r-Genregion betrifft (von insgesamt 27 ISR1-Insertionen sind 19 mit Deletionen korreliert; vergl. dazu Tab.10, Seite 127).

Die bisher beobachteten ISR1-induzierten Deletionen liegen in einem Größenbereich von 200 bp - 18.500 bp. Sie beginnen jeweils an den Enden der Insertion und lassen das ISR1-Element selbst intakt.

Auch Deletionen nach beiden Richtungen werden beobachtet. Es kann allerdings nicht unterschieden werden, ob die Deletionsbildung gleichzeitig an beiden ISR1-Enden begann und parallel in entgegengesetzten Richtungen erfolgte, oder in zwei unabhängigen, aufeinanderfolgenden Prozessen ablief.

Die im Zusammenhang mit ISR1_A und ISR1_K auftretenden Deletionen sind in Kapitel E.I.2 besprochen und in Abb.50 und Abb.51 schematisch dargestellt.

Für die ISR1_A-induzierten Deletionen scheinen keine definierten Endpunkte im RP4-Molekül zu existieren.

Obwohl die Definition des linken Endpunktes der ISR1_K-induzierten Deletionen meistens Schwierigkeiten bereitet, ist es ziemlich sicher, daß alle Deletionen im Bereich der HindIII-Stelle (kurz vorher oder nachher) enden.

Da Deletionen über diese Position hinaus die Lebensfähigkeit des RP4-Plasmids nicht beeinträchtigen, liegt an dieser Stelle möglicherweise ein definierter Endpunkt für ISR1-induzierte Deletionen (vergl. E.I.2.2).

In der anderen Richtung sind - außer bei Mutante RP4-5.4, die in E.I.2.3 behandelt ist - nur zwei verschiedene Endpunkte erkennbar. Die Deletion in dem Plasmid RP4-3.1 endet kurz vor der SmaI-Stelle S₅, während die Begrenzung aller anderen Deletionen etwa 250 bp rechts der PstI-Stelle P₅ liegt. Auch hier kann man wieder definierte Endpunkte vermuten.

Insgesamt läßt sich sagen, daß das Element ISR1 durchaus

ähnliche Merkmale aufweist, wie sie für klassische IS-Elemente beschrieben sind.

Wir betrachten daher ISR1 als ein neues Insertions-element und haben Dr. Esther Lederberg gebeten, ISR1 unter der Nummer IS11 in die Liste der IS-Elemente aufzunehmen.

E.IV : WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN ISR1 UND SEINER WIRTSZELLE

Genetische Untersuchungen von RP4::ISR1-Mutanten wurden im Rahmen der vorgestellten Arbeit in zwei verschiedenen Wirtsbakterien durchgeführt, in *Rhizobium lupini* und in *Escherichia coli*. Dabei ergaben sich bezüglich der Stabilitätseigenschaften grundsätzliche Unterschiede, die auf die Aktivität von ISR1 zurückgeführt werden können (vergl. dazu die Versuche der Abschnitte D.III und D.IV). Bevor diese Unterschiede im Verhalten von ISR1 diskutiert werden, soll kurz auf die Frage nach der Herkunft dieses Insertionselementes eingegangen werden.

IV.1 : HERKUNFT VON ISR1

Im Gegensatz zu den klassischen IS-Elementen (E.III) wurde ISR1 nicht in *E.coli*, sondern in dem Bodenbakterium *Rhizobium lupini* identifiziert, für das bisher noch kein IS- oder IS-ähnliches Element beschrieben ist.

Seit kurzem wird in dem verwandten Stamm *Rhizobium meliloti* eine IS-ähnliche Sequenz vermutet, die aber in Bezug auf Länge und Restriktionsstellen keine Ähnlichkeit mit ISR1 aufweist (Ausubel, 1980).

Innerhalb des untersuchten *R.lupini*-Stammes wurde die Insertion von ISR1 bisher nur auf dem Plasmid RP4 nachgewiesen. Es stellt sich damit die Frage nach dem Ursprung von ISR1. Stammt die Insertionssequenz ISR1 aus *R.lupini* oder aus dem RP4-Plasmid?

Das Plasmid RP4 ist von vielen Arbeitsgruppen sehr genau charakterisiert worden. Es ist keine Sequenz auf dem RP4-Molekül bekannt, die in Bezug auf Reihenfolge und Abstände der Restriktionsstellen Ähnlichkeiten mit ISR1 aufwies. Man kann daher ausschließen, daß ISR1 als natürliche Sequenz auf dem RP4-Plasmid vorliegt. Auch die Möglichkeit, daß die ISR1-Insertion durch Integration einer RP4-eigenen Nukleotidsequenz neu konstruiert wird, ist sehr unwahrscheinlich.

Sucht man den Ursprung von ISR1 im RP4-Molekül, läßt sich zudem nicht erklären, warum ISR1-Insertionen in RP4 der-

art häufig in *R.lupini* auftreten, nicht aber bei Vermehrung des RP4-Plasmids in Stämmen wie *E.coli*, auch nicht in anderen *Rhizobium*-Arten wie *R.meliloti* (Spitzbarth, 1976) oder *R.leguminosarum* (Beringer, 1974).

Wahrscheinlicher ist, daß ISR1 als normaler Bestandteil des Chromosoms in dem verwendeten *R.lupini*-Stamm vorliegt und von dort mit hoher Frequenz auf das RP4-Plasmid translociert.

Der Nachweis einer oder mehrerer ISR1-Sequenzen auf dem *R.lupini*-Genom ist allerdings bisher noch nicht erfolgt, kann aber leicht durch entsprechende Hybridisierungsversuche erbracht werden. Hinweise ergäben sich auch daraus, ein anderes IncP-Plasmid nach *R.lupini* zu übertragen und anschließend auf ISR1-Insertionen zu testen.

IV.2 : INAKTIVITÄT VON ISR1 IN E.COLI

In Kapitel D.IV.1.1 wurden 7 verschiedene RP4::ISR1-Mutanten sowohl im Rec^+ - als auch im Rec^- -Wirt über 60 Generationen kultiviert. Nach jeweils 15 Generationen wurden 200 - 300 Kolonien pro Stamm auf ihr Resistenzspektrum getestet. Insgesamt wurden also von jedem *E.coli*-Stamm etwa 1000 Kolonien ($4 \times \text{ca.} 250$) untersucht, das sind bei 14 verschiedenen Stämmen (7 Rec^+ -, 7 Rec^- -Stämme) 14.000 RP4-mutantentragende Einzelkolonien.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war die Isolierung von 2 (!) Tc-sensitiven RP4-Mutanten (RP4-5.81:Tc^S; RP4-13.2:Tc^S), deren Resistenzverlust noch dazu nicht in direkten Zusammenhang mit ISR1-Insertionen gebracht werden kann. Die Deletionen, die die Tc-Sensitivität hervorrufen, beginnen nicht, wie sonst üblich, an dem Ende eines ISR1-Elements, sondern mindesten 5 kb davon entfernt (vergl. Abb.39, Seite 106; Abb.40, Seite 107). Naheliegender ist die Vermutung, daß es sich hierbei um eine spontane Deletionsauslösung handelt.

In einem ähnlich aufgebauten Experiment (D.IV.1.2) wurde beim Test von 6 RP4-Mutanten nach 60 Generationen ein

Plasmid isoliert, das während dieser Kultivierung die Ap-Resistenz verloren hatte (RP4-13.1:Ap^S). In diesem Molekül konnte durch Restriktionsanalyse eine neu entstandene Deletion nachgewiesen werden, die am HindIII-Ende der ISR1_A-Insertion beginnt und sich etwa 1.6 kb in Richtung der EcoRI-Stelle ausdehnt (vergl. Abb.42, Seite 109). Diese Deletion ähnelt in ihren Eigenschaften den Deletionsvorgängen, die in aus *R.lupini* isolierten RP4-Mutanten auftreten.

Hier ist also ziemlich wahrscheinlich, daß die mutationsauslösende Deletion ISR1-stimuliert ist.

Außer diesen drei Plasmiden (RP4-5.81:Tc^S; RP4-13.2:Tc^S; RP4-13.1:Ap^S) konnten aus *E.coli* keine neu entstandenen RP4-Mutanten isoliert werden.

Das bedeutet zum einen, daß die deletogene Aktivität von ISR1, die in *R.lupini* sehr stark zum Ausdruck kommt, in *E.coli* nicht oder fast nicht ausgeprägt ist.

Zum anderen läßt sich daraus ableiten, daß in *E.coli* keine Transposition von ISR1 stattfindet; in keinem Fall wurden neue ISR1-Insertionen in RP4-Mutanten beobachtet, wie es zu erwarten wäre, wenn ISR1 von einer Stelle (z.B. Tn1) in andere Regionen des RP4-Plasmids translocieren könnte.

Ein ähnlich stabiles Verhalten zeigen die RP4::ISR1-Mutanten auch in anderen *Rhizobium*-Species, wie zum Beispiel in *R.meliloti* und *R.leguminosarum* (die entsprechenden Versuche wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beschrieben). Auch in diesen Stämmen ist also die Deletionsstimulierung und die Transpositionsfrequenz von ISR1 nicht oder nur kaum meßbar.

Diese Inaktivität von ISR1 in *E.coli* (ebenso in *R.meliloti* und *R.leguminosarum*) ist auf zweierlei Weise interpretierbar.

Die Ursache kann zum einen im RP4-Plasmid selbst liegen, indem dieses Plasmid einen Mechanismus besitzt, der letale

Ereignisse, wie z.B. zu häufige Insertionen, Mutationen oder Deletionen, verhindert. Eine solche RP4-eigene Schutzfunktion wurde auch schon im Zusammenhang mit der Stabilität des Plasmids RP4-5.82 in Betracht gezogen (vergl. E.I.1.2).

Im Hinblick auf die Instabilität von RP4 und RP4-Mutanten in *R.lupini* müßte man allerdings fordern, daß dieser Schutzmechanismus im zellulären System von *Rhizobium lupini* nicht wirksam ist.

Eine andere Möglichkeit ist, die Ursache in einer Wechselbeziehung zwischen dem ISR1-Element und dem Wirtsbakterium zu suchen. Das würde bedeuten, daß das Element ISR1 in seiner Aktivität (Transposition, Deletionsauslösung) abhängig ist von *R.lupini* und eventuell die enzymatische Umgebung dieses Stammes benötigt.

Unter diesem Aspekt sind eventuell auch die negativen Ergebnisse zu erklären, die bei den Versuchen, die Tc-Resistenz des Plasmids RP4-5.4, die ja transposonähnliche Struktur zeigt, auf andere Replikons zu translocieren (vergl. D.III.2, Abb.31, Seite 91).

Ebenso sollte dieser Aspekt bei der Betrachtung der Tn1::ISR1-codierten Proteine nicht außer acht gelassen werden. Das in *E.coli* erhaltene Proteilmuster läßt zwar kein ISR1-spezifisches Peptid erkennen (vergl. E.II.3), man sollte allerdings die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß ISR1-Information in *E.coli* nicht exprimiert wird. Es ist daher geplant, diese Proteinanalyse in einem *Rhizobium lupini* - Minizellensystem zu wiederholen.

IV.3 : AKTIVITÄT UND FUNKTION VON ISR1 IN *R.LUPINI*

Die Mutationsrate des RP4-Plasmids in *R.lupini* liegt in der Größenordnung von 10^{-1} bis 10^{-2} . Durch die vorliegenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß alle RP4-Mutationen in direktem Zusammenhang mit der Insertion von ISR1 stehen. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß ISR1 häufig im RP4-Molekül integriert ist, ohne phänotypisch erkennbare Veränderungen hervorzurufen.

Geht man davon aus, daß ISR1 als natürlicher Bestandteil des *R.lupini*-Chromosoms vorliegt, muß man eine extrem hohe Affinität zum RP4-Plasmid und eine Transpositionsfrequenz fordern, die größer ist als die Mutationsrate des RP4-Moleküls. Man kann davon ausgehen, daß jedes RP4-Plasmid, das in eine *R.lupini*-Zelle eingeführt wird, innerhalb kurzer Zeit durch eine ISR1-Insertion "markiert" wird.

Auch innerhalb des RP4-Moleküls zeigt ISR1 eine außerordentlich hohe Aktivität, was Transposition und Deletionsstimulierung betrifft.

Folge dieser ausgeprägten Aktivität ist das heterogene Plasmidgemisch, das jeden RP4- oder RP4-Mutanten-tragenden *R.lupini*-Stamm kennzeichnet.

Beispiele hierfür wurden in Kapitel D.I und D.III gegeben. Auch die als Tra^V bezeichneten RP4-Mutanten können unter diesem Blickwinkel erklärt werden (vergl. D.I.2.2.2, D.II.4.1). Diese Plasmidgruppe zeigte innerhalb der Species *R.lupini* keinen Transfer, konnte aber auf *E.coli* durch Konjugation übertragen werden, allerdings in einer zum Teil sehr reduzierten Rate (10^{-5} bis 10^{-9}). Sie wurden daher als transfervermindert (Tra^V) bezeichnet.

Innerhalb *E.coli* waren die Tra^V Plasmide normal transferierbar.

Die zwei restriktionsanalytisch charakterisierten Plasmide RP4-12 und RP4-13 zeigen keinerlei molekulare Veränderungen, die dieses Transferverhalten erklären würden (vergl. Abb.19, Seite 7q; Abb.37, Seite 98).

Verständlich wird das Verhalten der Tra^V Plasmide aber, wenn man die Heterogenität der Plasmidpopulation in *R.lupini* berücksichtigt. Man kann annehmen, daß in einer *R.lupini* (RP4: Tra^V)-Kultur der überwiegende Anteil der Plasmide echt transfernegativ (also Tra^-) ist, daß gleichzeitig aber einige wenige Moleküle mit normalen Transfereigenschaften vorhanden sind. Der Ausdruck RP4: Tra^V beschreibt somit nicht die Eigenschaft einer bestimmten Plasmidmutante, sondern steht für das Verhalten eines ganzen Plasmidgemisches. Bei einer Stempelkreuzung innerhalb *R.lupini* (D.I.1.2) tre-

ten die wenigen $RP4:Tra^+$ Plasmide nicht in Erscheinung. In der Filterkreuzung zwischen der *R.lupini* ($RP4:Tra^V$)-Donorkultur und *E.coli* (vergl.D.I.2.2.2), in der die Transferbedingungen wesentlich besser sind als bei Stempelkreuzungen, werden jedoch die wenigen Tra^+ Plasmide übertragen und täuschen einen reduzierten Resttransfer vor.

Daß die von *E.coli* erworbenen Plasmide normale Transfer-eigenschaften besitzen, läßt sich an ihrer Übertragungsfrequenz innerhalb *E.coli* und an den Ergebnissen der Fragmentanalyse erkennen.

Vermutlich sind die $ISR1$ -Insertionen und die damit verbundenen Deletionen nicht nur die Ursache für das häufige Auftreten von Plasmid-Mutanten, sondern auch der Grund für die extrem hohen Verlustraten des $RP4$ -Moleküls in *R.lupini*. Ein Hinweis dafür sind die Plasmidringe unterschiedlicher Größe, die sich in der elektronenmikroskopischen Präparation von $RP4$ -DNA aus *R.lupini* darstellen (Tucher, 1974). Sie können als Degradations-Produkte interpretiert werden, die durch Rekombination zwischen zwei $ISR1$ -Sequenzen und durch Deletionsvorgänge erzeugt werden.

Daß solch kleine $RP4$ -Moleküle nie quantitativ isoliert werden konnten, mag daran liegen, daß sie z.B. nicht replizieren können und verloren gehen (die Replikationsfunktionen liegen in verschiedenen Regionen des $RP4$ -Moleküls, vergl. Abb. 49, Seite 134).

Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß die Transpositions-, Mutations- und Deletionsfrequenzen, die in Bezug auf das $RP4$ -Molekül beobachtet werden, auch für $ISR1$ -Insertionen im *R.lupini*-Chromosom gelten.

Strukturelle Veränderungen in dieser Häufigkeit und in diesem Ausmaß würden die Stabilität des Genoms und damit die Lebensfähigkeit der *R.lupini*-Zelle beträchtlich stören. Allerdings machte Pühler (1976) die Beobachtung, daß der Lebendtitel einer *R.lupini*-Kultur in der Stationärphase stark abnimmt. Im Zusammenhang mit $ISR1$ könnte dieses Absinken den Abbau des Chromosoms bedeuten.

Insgesamt muß man aber davon ausgehen, daß zumindest während der Wachstumsperiode die Frequenz, mit der ISR1 innerhalb des *R.lupini*-Chromosoms translociert bzw. Mutationen und Deletionen auslöst, vergleichbar ist mit den Raten der klassischen IS-Elemente.

Man kann also einen Regulationsmechanismus diskutieren, der die Aktivität von ISR1 innerhalb des Chromosoms reduziert; in Bezug auf Fremd-DNA, wie das RP4-Plasmid, unterliegt das ISR1-Element keiner Beschränkung und verursacht im Verlaufe weniger Generationen die vollständige Eliminierung dieser DNA.

Bleibt die Frage nach der Bedeutung des ISR1-Elements im *R.lupini*-Genom.

Über die Funktion von IS-Elementen kann derzeit nur spekuliert werden.

Manche Autoren (Orgel und Crick, 1980; Doolittle und Sapienza, 1980) betrachten Insertionssequenzen als unnütze, egoistische Gene ("selfish DNA", "selfish genes"), deren einzige "Funktion" darin besteht, innerhalb des Wirtsgenoms zu überleben.

Im allgemeinen spricht man den translocierbaren Elementen jedoch eine wichtige physiologische und evolutionäre Bedeutung zu. Ein IS-Element z.B. kann nicht-homologe DNA auf verschiedene Weise verknüpfen, etwa durch Flankieren einer zu transportierenden DNA-Sequenz, durch Vereinigung zweier Replikons zu einem Cointegrat oder durch Veränderungen im Genom, wie z.B. Deletionen und Inversionen.

Heumann (1980) beschreibt für verschiedene Rhizobien-Arten und für *Agrobacterium* Stammvariationen, die unter bestimmten Wachstumsbedingungen ineinander übergehen.

So entsteht aus dem auch in vorliegender Arbeit verwendeten *R.lupini*-Stamm (car-Typ) über mehrere Stufen eine als nif-Typ bezeichnete Variante. Solche Übergänge sind teilweise reversibel (Conversion), z.T. aber auch irreversibel (Segregation).

Der Autor führt diese Variationen auf eine Umorganisation des Chromosoms zurück, wobei die Conversion eine Genom-

veränderung ohne DNA-Gewinn oder -Verlust bedeutet, während als Ursache der Segregation der Verlust genetischer Information vermutet wird.

Die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen einer Umorganisation des *R.lupini*-Genoms und dem ISR1-Element ist zur Zeit noch spekulativ. Bei den weiteren Untersuchungen sollte jedoch dieser Aspekt nicht außer acht gelassen werden.

Anhang 1:

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Ap	: Ampicillin
ara	: Gen für Arabinose-Abbau
AS	: Aminosäure(n)
B	: Restriktionsenzym <u>B</u> amHI
bla	: Gen für β -Lactamase-Produktion
bp	: Basenpaar(e)
car l	: Carotinoid weiß (<u>l</u> eucos)
car y	: Carotinoid gelb (<u>y</u> ellow)
car-Typ	: Carotinoid-Typ
cat	: Gen für <u>C</u> hloramphenicol- <u>a</u> cetyl- <u>t</u> ransferase-Produktion
ccc-DNA (-Form)	: kovalent geschlossener DNA-Ring (<u>c</u> ovalently <u>c</u> losed <u>c</u> ircle)
Cm	: Chloramphenicol
cpm	: radioaktive Zerfälle pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)
CsCl	: Cäsiumchlorid
Cytc	: Cytochrom c
c1-ts	: <u>t</u> emperatur- <u>s</u> ensitiver c1-Repressor des Phagen P1
d	: Dalton
DNA	: Desoxyribonucleinsäure (<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid)
DM	: Davis Minimal Medium
DMglu	: Davis Minimal Medium mit Glucose
DMSO	: <u>D</u> imethylsulfoxid
ds	: doppelsträngig (<u>d</u> ouble <u>s</u> tranded)
E	: Restriktionsenzym <u>E</u> coRI
E.coli	: Escherichia coli
EtBr	: Äthidiumbromid

F	: Fertilitätsplasmid von E.coli
F'	: F-Plasmid mit integrierten chromosomalen Genen, z.B. F'(lac,pro)
Fc	: Fertilitätsregion c des R.lupini-Chromosoms
Fd	: Fertilitätsregion d des R.lupini-Chromosoms
gram	: Gramfärbung
H	: Restriktionsenzym <u>H</u> indIII
his	: Gen für Histidinbiosynthese
IS	: Insertionssequenz (<u>i</u> n <u>s</u> erted <u>s</u> equ <u>e</u> nce)
K	: Kilodalton (10^3 Dalton)
kb	: Kilobasen (1000 bp)
Km	: Kanamycin
lac	: Gen für Lactose-Verwertung
LB	: Luria Broth
LBCase	: Luria Broth mit Calcium-Zusatz
leu	: Gen für Leucinbiosynthese
log	: logarithmisch
M	: molar
mM	: millimolar
MM	: Minimalmedium
m	: Multiplizität
m ⁻	: modifikationsdefekt
minA	: Gen A für Minizellenproduktion
minB	: Gen B für Minizellenproduktion
MW	: Molekulargewicht (<u>m</u> olecular <u>w</u> eight)
Na	: Natrium
NB	: Nutrient Broth
NC	: Nitrocellulose
Nc	: Natriumcitrat
nif	: Stickstoff-Fixierung (<u>n</u> itrogen <u>f</u> ixation)
Nx	: Nalidixin

oc-DNA (-Form)	: offener DNA-Ring (<u>o</u> pen <u>c</u> ircle)
OD	: optische Dichte
oriV	: Startpunkt (<u>o</u> ri <u>g</u> in) der <u>v</u> egetativen Replikation
oriT	: Startpunkt (<u>o</u> ri <u>g</u> in) der <u>T</u> ransfer- Replikation
P	: Restriktionsenzym <u>P</u> stI
PA	: Penassay
PAA	: <u>P</u> oly <u>a</u> cryl <u>a</u> mid
PPD	: 2,5-Diphenyloxazol
pro	: Gen für Prolinbiosynthese
prt	: prototroph
Pt/Ir	: Platin/Iridium
r	: Resistenz, resistent
r ⁻	: restriktionsdefekt
Rec	: Rekombination
recA	: Gen A für Rekombination
R-Plasmid	: Resistenz-Plasmid
R.lupini	: Rhizobium lupini
rpm	: Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute)
S	: Restriktionsenzym <u>S</u> maI
s	: Sensitivität, sensitiv
SDS	: Dodecylsulfat-NaSalz
Sm	: Streptomycin
ss	: einzelsträngig (<u>s</u> ingle <u>s</u> tranded)
Tc	: Tetracyclin
TCA	: Trichloressigsäure
thi ⁻	: Gen für Thiaminbiosynthese
thr	: Gen für Threoninbiosynthese
thy	: Gen für Thyminbiosynthese
Tn	: Transposon
Tn1	: Ampicillin-Transposon des RP4-Plasmids
Tn3	: Ampicillin-Transposon des Plasmids R1-19
TnC, Tn7	: Transposon mit Sm- und Tp-Resistenz
Tp	: Trimethoprim

Tra	: Transferfähigkeit
trf	: <u>t</u> ransaktive <u>R</u> eplikations <u>f</u> unktion
ts	: <u>t</u> emperat <u>u</u> rsensitiv
ÜK	: <u>Ü</u> bernacht- <u>K</u> ultur
WT	: <u>W</u> ild <u>t</u> yp
w/v	: Gewicht pro Volumen (<u>w</u> eight per <u>v</u> olume)

Anhang 2:

LITERATURVERZEICHNIS

- ARMSTRONG, K. und D.R.HELINSKI (1977): Restriction Map of the ColE1 Derivative pCR1.
in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes;
eds. Bukhari, A.I., J.A.Shapiro and S.L.Adhya; Cold
Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;
Seite 681
- ARTHUR, A. und D.SHERRATT (1979): Dissection of the Trans-
position Process: A Transposon-Encoded Site-Specific
Recombination System.
Mol.gen.Genet. 175, 267-274
- AUSUBEL, F. (1980): persönliche Mitteilung
- BÄCHI, B. und W.ARBBER (1977): Physical mapping of BglII,
BamHI, EcoRI, HindIII and PstI restriction fragments
of bacteriophage P1 DNA.
- BARTH, P.T. und N.J.GRINTER (1977a): Map of Plasmid RP4
Derived by Insertion of Transposon C.
J.Mol.Biol. 113, 455
- BARTH, P.T. und N.J.GRINTER (1977b): A Tn7 Insertion Map
of RP4.
in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes;
eds. Bukhari, A.I., J.A.Shapiro and S.L.Adhya; Cold
Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;
Seite 675
- BARTH, P.T., N.J.GRINTER und D.E.BRADLEY (1978): Conjugal
Transfer System of Plasmid RP4: Analysis by Trans-
poson 7 Insertion.
J.Bacteriol. 133, 43
- BARTH, P.T. (1979): RP4 and R300B as wide host-range plas-
mid cloning vehicles.
in Plasmids of Medical, Environmental and Commercial
Importance; eds. Timmis, K.N. und A.Pühler; Elsevier/
North-Holland Biomedical Press; Seite 399
- BAZARAL, M. und D.R.HELINSKI (1968): Circular DNA Forms
of Colicinogenic Factors E1, E2 and E3 from Escherichia
coli.
J.Mol.Biol. 36, 185-194

- BAZARAL, M. und D.R.HELINSKI (1970): Reference of a bacterial plasmid and an episome in *Escherichia coli*.
Biochem. 9, 399-406
- BAZARAL, M. und D.R.HELINSKI (1972): Characterization of multiple circular DNA forms of colicinogenic factor E1 from *Proteus mirabilis*.
Biochem. 7, 3513-3520
- BENNETT, P.M., J.GRINSTED, C.L.CHOI und M.H.RICHMOND (1978): Characterization of Tn501, a transposon determining resistance to mercuric ions.
Mol.gen.Genet. 159, 101-106
- BERINGER, J.E. (1974): R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*.
J.Gen.Microbiol. 84, 188
- BIBB, M.J. und D.A.HOPWOOD (1978): Genetic and physical characterization of a *Streptomyces coelicolor* sex factor.
in *Microbiology 1978* (ed.D.Schlessinger); Washington D.C.; American Society for Microbiology; 139-141
- BLACK, W.A. und R.W.A.GIRDWOOD (1969): Carbenicillin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.
British Medical Journal iv, 234
- BOLIVAR, F., R.L.RODRIGUEZ, M.C.BETLACH und H.W.BOYER (1977a): Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin resistant derivatives of plasmid pMB9.
Gene 2, 75-93
- BOLIVAR, F., R.L.RODRIGUEZ, P.J.GREEN, M.C.BETLACH, H.L. HEYNECKER, H.W.BOYER, J.H.CROSA und S.FALKOW (1977b): Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multiple cloning system.
Gene 2, 95-113
- BUKHARI, A.I., J.A.SHAPIRO und S.L.ADHYA (eds) (1977): DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;
- BUKARDT, H.J. (1972): Genetische Untersuchungen zur Transmission des R-Faktors in *Rhizobium lupini*.
Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg

- BURKARDT, H.J., U. PRIEFER, A. PÜHLER, G. RIESS und P. SPITZ-BARTH (1979a): Naturally occurring insertion mutants of broad host range plasmids RP4 and R68. in Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance; eds. Timmis, K.N und A. Pühler; Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Seite 387
- BURKARDT, H.J., G. RIESS und A. PÜHLER (1979b): Relationship of Group P1 Plasmids Revealed by Heteroduplex Experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 Are Identical. J.Gen.Microbiol. 114, 341
- BURKARDT, H.J. (1980): persönliche Mitteilung
- CALOS, M.P. und J.H. MILLER (1980): Transposable Elements. Cell 20, 579-595
- CAMPBELL, A., D.E. BERG, D. BOTSTEIN, E.M. LEDERBERG, R.P. NOVICK, P. STARLINGER und W. SZYBALSKI (1977): Nomenclature of Transposable Elements in Procaryotes. in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes; eds. Bukhari, A.I., J.A. Shapiro and S.L. Adhya; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Seite 15
- CHANG, A.C.Y. und S.N. COHEN (1978): Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J.Bacteriol. 134, 1141-1156
- CHOU, J., P.G. LEMAUX, M.J. CASADABAN und S.N. COHEN (1979a): Transposition protein of Tn3: identification and characterization of an essential repressor-controlled gene product. Nature 282, 801
- CHOU, J., M.J. CASADABAN, P.G. LEMAUX und S.N. COHEN (1979b): Identification and characterization of a self-regulated repressor of translocation of the Tn3 element. Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 76, 4020
- CHOW, L.T. und T.R. BROKER (1978): Adjacent insertion sequences IS2 and IS5 in phage Mu mutants and an IS5 in a lambda darg phage. J.Bacteriol. 133, 1427-1436

- CLEWELL, D.B. (1972): Nature of ColE₁ plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol.
J.Bacteriol. 110, 667-676
- CLOWES, R.C. (1972): Molecular Structure of Bacterial Plasmids.
Bacteriological Reviews, 36, 3, 361-405
- COHEN, S.N. (1976): Transposable genetic elements and plasmid evolution.
Nature 263, 731-738
- CORNELIS, G., D.GHOSAL und H.SAEDLER (1978): Tn951: a new transposon carrying a lactose operon.
Mol.gen.Genet. 160, 215-224
- DATTA, N., R.W.HEDGES, E.J.SHAW, R.B.SYKES und M.H.RICHMOND (1971): Properties of an R Factor from *Pseudomonas aeruginosa*.
J.Bacteriol. 108, 1244
- DATTA, N. und R.W.HEDGES (1972): Hostrange of R factors.
J.Gen.Microbiol. 70, 453
- DEPICKER, A., M.VAN MONTAGU und J.SCHELL (1977): Physical Map of RP4.
in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes; eds. Bukhari, A.I., J.A.Shapiro und S.L.Adhya; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Seite 678
- DOOLITTLE, W.F. und C.SAPIENZA (1980): Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution.
Nature 284, 601
- DOUGAN, G. und D.SHERRATT (1977): The Transposon Tn1 as a Probe for Studying ColE1 Structure and Function.
Mol.gen.Genet. 151, 151-160
- DOUGAN, G., M.SAUL, A.TWIGG, R.GILL und D.SHERRATT (1979): Polypeptides Expressed in *Escherichia coli* K-12 Minicells by Transposition Elements Tn1 und Tn3.
J.Bacteriol. 138, 48-54

- FIGURSKI, D., R. MEYER, D. S. MILLER und D. R. HELINSKI (1976):
Generation in vitro of deletions in the broad host
range plasmid RK2 using phage Mu insertions and a
restriction endonuclease.
Gene 1, 107
- GHOSAL, D., H. SOMMER und H. SAEDLER (1979): Nucleotide
sequence of the transposable DNA element IS2.
Nucleic Acid Res. 6, 1111-1122
- GILL, R., F. HEFFRON, G. DOUGAN und S. FALKOW (1978): Analysis
of sequences transposed by complementation of two
classes of transposition-deficient mutants of Tn3.
J. Bacteriol. 136, 742-756
- GILL, R. E., F. HEFFRON und S. FALKOW (1979): Identification
of the protein encoded by the transposable element
Tn3 which is required for its transposition.
Nature 282, 797-801
- GLOVER, D. M. (1976): persönliche Mitteilung
- GOTTESMANN, M. M. und J. L. ROSNER (1975): The acquisition of
a determinant for chloramphenicol resistance by coli-
phage lambda.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 5041-5045
- GRINDLEY, N. D. F. und D. SHERRATT (1979): Sequence analysis
at IS1 insertion sites: models for transposition.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 1257-1261
- GRINSTED, J., J. R. SAUNDERS, L. C. INGRAM, R. B. SYKES und M. H.
RICHMOND (1972): Properties of an R Factor which
Originated in Pseudomonas aeruginosa 1822.
J. Bacteriol. 110, 2, 529-537
- GRINSTED, J., P. M. BENNETT und M. H. RICHMOND (1977): A Re-
striction Enzyme Map of R-Plasmid RP1.
Plasmid 1, 34
- HEDGES, R. W. (1971): persönliche Mitteilung
- HEDGES, R. W. und A. E. JACOB (1974): Transposition of Ampicillin
Resistance from RP4 to Other Replicons.
Mol. gen. Genet. 132, 31

- HEFFRON, F., C. RUBENS und S. FALKOW (1975a): Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance: Molecular nature and specificity of insertion.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3623
- HEFFRON, F., R. SUBLETT, R. HEDGES, A. JACOB und S. FALKOW (1975b): Origin of the TEM Beta-Lactamase Gene Found on Plasmids.
J. Bacteriol. 122, 250
- HEFFRON, F., C. RUBENS und S. FALKOW (1977a): Transposition of a Plasmid Deoxyribonucleic Acid Sequence That Mediates Ampicillin Resistance: Identity of Laboratory Constructed Plasmids and Clinical Isolates.
J. Bacteriol. 129, 1, 530-533
- HEFFRON, F., P. BEDINGER, J. J. CHAMPOUX und S. FALKOW (1977b): Deletions affecting the transposition of an antibiotic resistance gene.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 702-706
- HEFFRON, F., M. SO und B. J. MCCARTHY (1978): In vitro mutagenesis using synthetic restriction sites.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 6012-6016
- HEFFRON, F., B. J. MCCARTHY, H. OHTSUBO und E. OHTSUBO (1979): Sequence Analysis of the Transposon Tn3: Three Genes and Three Sites Involved in Transposition of Tn3.
Cell 18, 1153-1163
- HEUMANN, W. (1968): Conjugation in starforming *Rhizobium lupini*.
Mol. gen. Genet. 102, 132
- HEUMANN, W., A. PÜHLER und E. WAGNER (1971): The two transfer regions of the *Rhizobium lupini* conjugation. I. Fertility factor elimination and one way transfer.
Mol. gen. Genet. 113, 308-315
- HEUMANN, W., A. PÜHLER und E. WAGNER (1973): The two transfer regions of the *Rhizobium lupini* conjugation. II. Genetic characterization of the transferred chromosomal segments.
Mol. gen. Genet. 126, 267-274
- HEUMANN, W. (1980): *Rhizobium* Genetics
in Proceedings of the Symposium on Biochemistry and Physiology of Nitrogen and Sulfur Metabolism; Bochum 1980; Springer Verlag (in press)

- HOLLOWAY, B.W. und M.H.RICHMOND (1973): R factors used for genetic studies in strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their origin.
Genet.Res., 21, 103
- HOLLOWAY, B.W. (1979): Plasmids that mobilize bacterial chromosome.
Plasmid 2, 1
- HOWE, M.M. und E.G.BADE (1975): Molecular biology of bacteriophage Mu.
Science 190, 624
- INGRAM, L.C., M.H.RICHMOND und R.B.SYKES (1973): Molecular characterization of the R-factors implicated in the carbenicillin resistance of a sequence of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burns.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 3, 279-288
- INSELBURG, J. und M.FUKE (1970): Replicating DNA: Structure of colicin factor E1.
Science 169, 590-592
- INSELBURG, J. und B.APPLEBAUM (1978): Proteins Synthesized in Minicells Containing Plasmid ColE1 and Its Mutants.
J.Bacteriol. 133, 3, 1444-1451
- JOHNSRUD, L. (1979): DNA Sequence of the Transposable Element IS1.
Mol.gen.Genet. 169, 213-218
- KLECKNER, N. (1977): Translocatable elements in procaryotes.
Cell 11, 11-23
- KLEINSCHMIDT, A.K. und R.K.ZAHN (1959): Über Desoxyribonucleinsäure-Molekeln in Protein-Mischfilmen.
Zeitschrift für Naturforschung 14b, 770-779
- KLEINSCHMIDT, A.K. (1968): Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules.
Methods in Enzymology 12, 361-377
- KLIPP, W. (1980): persönliche Mitteilung
- KONDO, E. und S.MITSUHASHI (1964): Drug resistance of enteric bacteria: VI. Active transducing bacteriophage P1Cm produced by the combination of R factor with bacteriophage P1.
J.Bacteriol. 88, 1266-1276

- KOPECKO, D. und S.N.COHEN (1975): Site-specific recA-independent recombination between bacterial plasmids: involvement of palindromes at the recombinational loci.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 72, 1373-1377
- KOPECKO, D.J. (1979): Specialized Genetic Recombination Systems in Bacteria: Their Involvement in Gene Expression and Evolution.
Progress in Molec. and Subcell. Biology, 7
- KRETSCHMER, P.J. und S.N.COHEN (1977): Selected Translocation of Plasmid Genes: Frequency and Regional Specificity of Translocation of the Tn3 Element.
J.Bacteriol. 130, 2, 888-899
- LEVY, S.B. (1974): R factor proteins synthesized in Escherichia coli minicells: Incorporation studies with different R factors and detection of deoxyribonucleic acid binding proteins.
J.Bacteriol. 120, 1451-1463
- LEVY, S.B. (1975): Very stable messenger RNA in chromosomeless E.coli mini-cells.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72, 2900-2904
- LOWBURY, E.J.L., A.KIDSON, H.A.LILLY, G.D.J.AYLIFFE und R.J.JONES (1969): Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics: emergence of strains highly resistant to carbenicillin.
Lancet ii, 448-452
- McCLINTOCK, B. (1952): Chromosome organization and gene expression.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16, 13-47
- MEYER, R., D.FIGURSKI und D.R.HELINSKI (1977): Restriction enzyme map of RK2.
in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes; eds. Bukhari, A.I., J.A.Shapiro, and S.L.Adhya; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;
- MILLER, J.H. (1972): Experiments in Molecular Genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- NEVERS, P. und H.SAEDLER (1977): Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements.
Nature 268, 109-115

- NEVERS, P. und H. SAEDLER (1978): Mapping and characterization of an *E. coli* mutant defective in IS1-mediated deletion formation.
Mol. gen. Genet. 160, 209-214
- NOMURA, M. (1967): Colicins and other related bacteriocins.
Ann. Rev. Microbiol. 21, 257-284
- NOVICK, R. P., I. EDELMAN, M. D. SCHWESSINGER, A. D. GRUSS, E. C. SWANSON und P. A. PATTEE (1979): Genetic translocation in *Staphylococcus aureus*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 400-404
- O'GARA, F. und L. K. DUNICAN (1973): Transformation and Physical Properties of R-Factor RP4 Transferred from *Escherichia coli* to *Rhizobium trifolii*.
J. Bacteriol. 116, 1177
- OHTSUBO, H. und E. OHTSUBO (1977): Repeated DNA Sequences in plasmids, phages and bacterial chromosomes.
in *DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes*; eds. Bukhari, A. I., J. A. Shapiro und S. L. Adhya; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;
- OHTSUBO, H. und E. OHTSUBO (1978): Nucleotide sequence of an insertion element IS1.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 615-619
- OHTSUBO, H., H. OHMORI und E. OHTSUBO (1979): Nucleotide sequence analysis of the ampicillin resistance transposon Tn3: implications for insertion and deletion.
Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 43, 1269
- OLSEN, R. H. und P. SHIPLEY (1973): Host Range and Properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R-Factor R1822.
J. Bacteriol. 113, 2, 772-780
- ORGEL, L. E. und F. H. C. CRICK (1980): Selfish DNA: the ultimate parasite.
Nature 284, 604
- PHILIPPSEN, P. und R. W. DAVIS (1978): Restriction endonuclease cleavage map for λ PAPA C1857.
Focus 1, 5
- PÜHLER, A. (1971): Die Kompetenz von Donor und Rezipient in der *R. lupini* Konjugation.
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

- PÜHLER, A., H.J.BURKARDT, R.E.MATTES und W.HEUMANN (1974):
Genetische Untersuchungen an Resistenzfaktoren der
Klasse P in *Rhizobium lupini*.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 228, 168-174
- PÜHLER, A. (1976): Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4
aus *Pseudomonas aeruginosa* in dem Bodenbakterium *Rhizo-*
bium lupini und in dem Enterobakterium *Escherichia coli*.
Habilitationsschrift, Universität Erlangen-Nürnberg
- PÜHLER, A. und G.KRAUSS (1977): Transposition of the Ampicillin Resistance gene from the RP4 factor to the bacteriophage P1 and to the *Escherichia coli* fertility factor.
in Plasmids 3rd Int. Symp. on Antibiotic Resistance;
eds. Mitsuhashi, S., L.Rosival und V.KrČmery; Avenicum
Prague, Springer Verlag, 151-160
- PÜHLER, A. und H.J.BURKARDT (1978): Fertility Inhibition
in *Rhizobium lupini* by the Resistance Plasmid RP4.
Mol.gen.Genet. 162, 163
- REEVE, J.N. (1977): Bacteriophage infection of minicells.
A general method for identification of in vivo bacteriophage directed polypeptide biosynthesis.
Mol.gen.Genet. 158, 73-79
- REEVE, J.N. (1978): Selective expression of transduced or cloned DNA in minicells containing plasmid pKB280.
Nature 276, 728
- REIF, H.J. und H.SAEDLER (1977): Chromosomal rearrangements
in the gal region of *E.coli* K-12 after integration of IS1.
in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes;
eds. Bukhari, A.I., J.A.Shapiro und S.L.Adhya; Cold
Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY;
Seite 81-91
- RICHMOND, D.H. und R.B.SYKES (1972): The chromosomal integration of a β -lactamase gene derived from the P-type R-factor RP1 in *Escherichia coli*.
Genet.Res. 20, 231-237
- RIESS, G. (1980): persönliche Mitteilung
- ROSNER, J.L. (1972): Formation, induction and curing of bacteriophage P1 lysogens.
Virology 48, 679

- RUBENS, C., F. HEFFRON und S. FALKOW (1976): Transposition of a Plasmid Deoxyribonucleic Acid Sequence That Mediates Ampicillin Resistance: Independence from Host *rec* Functions and Orientation of Insertion.
J. Bacteriol. 128, 1, 425-434
- SAEDLER, H. und D. GHOSAL (1977): Properties of DNA insertion elements in *E. coli*.
in R factors: their properties and possible control;
eds. J. Drews and G. Hogenauer; New York; Springer Verlag;
Seite 131-140
- SCHMITT, R., R. MATTES, K. SCHMID und J. ALTENBUCHER (1979):
Raf- and Tc-plasmids in strains of *Escherichia coli* and their possible role in enteropathogeny.
in Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance; eds. K. N. Timmis und A. Pühler; Elsevier/
North-Holland Biomedical Press; Seite 199
- SCHÖFFL, F. und A. PÜHLER (1979a): Intramolecular amplification of the tetracyclin resistance determinant of transposon Tn1771 in *Escherichia coli*.
Genet. Res. Camb. 33, 253-260
- SCHÖFFL, F. und A. PÜHLER (1979b): The plasmid system of *Escherichia coli* strain UR12644: Identification and molecular characteristics of transposons involved in the generation of endogenous R-plasmids.
Genet. Res. Camb. 34, 287-301
- SCHWARTZ, S. A. und D. R. HELINSKI (1971): Purification and characterization of colicin E1.
J. Biol. Chem. 246, 6318-6327
- SHAPIRO, J. A. (1979): Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage μ and other transposable sequences.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1933-1937
- SHARP, P. A., M. T. HSU, E. OHTSUBO und N. DAVIDSON (1972):
Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. I. Structure of F-prime factors.
J. Mol. Biol. 71, 471-497
- SHERRATT, D. und A. ARTHUR (1980): Transposon-specified site-specific recombination systems.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45, in press

- SPITZBARTH, M. (1976): Untersuchung des Resistenzfaktors RP4 in *Rhizobium meliloti*.
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg
- SPITZBARTH, P. (1978): Molekulare Charakterisierung von Insertionsmutanten des RP4-Plasmids.
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg
- STANISICH, V.A. und B.W.HOLLOWAY (1971): Chromosome transfer in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by R factors.
Genet.Res. 17, 169-172
- STANISICH, V.A. und P.M.BENNETT (1976): Isolation and Characterization of deletion mutants involving the transfer genes of P group plasmids in *P.aeruginosa*.
Mol.gen.Genet. 149, 211
- STANISICH, V.A., P.M.BENNETT und M.H.RICHMOND (1977): Characterization of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a nonconjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*.
J.Bacteriol. 129, 1227-1233
- STARLINGER, P. und H.SAEDLER (1976): IS-elements in microorganisms.
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 75, 111-152
- STARLINGER, P. (1980): IS Elements and Transposons.
Plasmids 3, 241-250
- STUDIER, F.W. (1973): Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels.
J.Mol.Biol. 79, 237-248
- SUTCLIFFE, G. (1978): Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *E.coli* plasmid pBR322.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75, 3737-3741
- SUTCLIFFE, J.G. (1979): Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* Plasmid pBR322.
Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 43, 77-90
- THOMAS, C.M., D.STALKER, D.GUINEY und D.R.HELINSKI (1979): Essential regions for the replication and conjugal transfer of the broad host range plasmid RK2.
in *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*; eds. K.N.Timmis und A.Pühler; Elsevier/
North-Holland Biomedical Press; Seite 375

TUCHER, R. (1974): Untersuchungen an RP4-DNA in Minizellen
von *Rhizobium lupini*.

Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

YAGI, Y. und D. B. CLEWELL (1977): Identification and characterization of a small sequence located at two sites on the amplifiable tetracycline resistance plasmid pAM α 1 in *Streptococcus faecalis*.

J. Bacteriol. 129, 400-406

YAMADA, Y., K. L. CALAME, J. N. GRINDLEY und D. NAKADA (1979): Location of an ampicillin resistance transposon Tn1701 in a group of small nontransferring plasmids.

J. Bacteriol. 137, 990-999

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die am Zustandekommen dieser Dissertation mehr oder weniger wesentlichen Anteil haben.

Herrn Prof. Dr. W. Heumann möchte ich herzlich für die Aufnahme an seinem Institut und die guten Arbeitsbedingungen, die ich dort vorgefunden habe, danken.

Mein spezieller Dank gilt meinem "Doktor-Vater", Herrn Prof. Dr. A. Pühler, der meine Dissertation mit engagiertem wissenschaftlichen Interesse und unermüdlicher Diskussionsbereitschaft betreute. Ohne sein Zutun wäre diese Arbeit in der jetzigen Form nicht denkbar gewesen.

Besonders dankbar bin ich Herrn Dr. H.J. Burkardt, von dem die elektronenmikroskopischen Darstellungen stammen. Seine aktive Unterstützung ersparte es mir, mich mit den Techniken und Tücken der Elektronenmikroskopie vertraut zu machen.

Danken möchte ich auch der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mich während meiner Promotionszeit finanziell unterstützte und es mir dadurch erlaubte, mich in vollem Maße meiner wissenschaftlichen Arbeit zu widmen.

Die vorliegende Dissertation war Teil des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekts Pu 28/8. Die DFG ermöglichte mir auch durch eine großzügige Reisebeihilfe, an dem 45. Symposium in Cold Spring Harbor, New York, USA, teilzunehmen und dort Teile dieser Arbeit anerkannten Wissenschaftlern vorzustellen.

Schließlich möchte ich diese Gelegenheit nutzen, allen Institutsmitgliedern für ihre Freundschaft und ihre bereitwillige Hilfe zu danken.

Besonders erwähnen möchte ich Dr. Reinhard Simon und Werner Klipp, die beide durch ihre tatkräftige Unterstützung und ihren Einfallsreichtum sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Lebenslauf

Name : Ursula Priefer

Geburtstag : 10. Mai 1950

Geburtsort : Amberg

Eltern : Edmund und Karolina Priefer, geb. Bothner

1956-1960 : Volksschule in Amberg

1960-1969 : Neusprachliches Gymnasium in Amberg

28.06.1969 : Reifeprüfung

1970-1976 : Biologiestudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

31.10.1972 : Diplombiologen-Vorprüfung

28.07.1976 : Diplombiologen-Hauptprüfung

Thema der Diplomarbeit:
Die Transposition der Ampicillinresistenz
vom Resistenzfaktor RP4 auf den Fertilitäts-
faktor von Escherichia coli

ab Ende 1976 : Promotion am Institut für Mikrobiologie und
Biochemie der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Ende 1976 bis: Stipendium der Studienstiftung des Deutschen
Ende 1979 Volkes

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30

Tel. 09131-26197